

Dissertation zur Erlangung des Doktorgrades
der Fakultät für Chemie und Pharmazie
der Ludwig-Maximilians-Universität München

**Identifizierung und Charakterisierung
von Tetrahydrocarbazolen als neuartige
Wirkstoffklasse für die Therapie des
Morbus Alzheimer**

Alexander Daschner

aus

München, Deutschland

2013

Erklärung

Diese Dissertation wurde im Sinne von §7 der Promotionsordnung vom 28. November 2011 von Herrn Prof. Dr. Jochen Herms betreut und von Herrn Prof. Dr. Franz Bracher von der Fakultät für Chemie und Pharmazie vertreten.

Eidesstattliche Versicherung

Diese Dissertation wurde eigenständig und ohne unerlaubte Hilfe erarbeitet.

München, den 1. August 2013



Alexander Daschner

Dissertation eingereicht am 1. August 2013

1. Gutachter: Prof. Dr. Franz Bracher

2. Gutachter: Prof. Dr. Jochen Herms

Mündliche Prüfung am 18. November 2013

Diese Arbeit widme ich meiner geliebten Ehefrau und meiner Familie.

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	12
1.1	Morbus Alzheimer	12
1.1.1	Histopathologie des Morbus Alzheimers	14
1.1.2	Amyloid-Vorläuferprotein (APP)	16
1.1.3	Präseniline	18
1.1.4	Kalzium, Mitochondrien und Morbus Alzheimer	19
1.2	Medikamentöse Therapie des Morbus Alzheimer	22
1.2.1	Vorhandene Therapiemöglichkeiten	22
1.2.2	Medikamente in der Entwicklung	26
1.2.3	Zusammenfassung	33
2	Material und Methoden	35
2.1	Untersuchung der Freisetzung von Kalzium aus dem ER	35
2.2	Die Substanzbibliothek DIVERSet™	39
2.3	Synthese von Tetrahydrocarbazolen und der MTT Test	39
2.4	Strukturelle Clusteranalyse	40
2.5	Untersuchung des mitochondrialen Membranpotentials	41
2.6	Untersuchung der A β -Peptid Spiegel	43
2.7	Glutamattoxizität	45
2.8	In vivo Versuche	49
2.8.1	Toxikologie	49
2.8.2	Untersuchung der Verabreichungsform und Dosierung	51
2.8.3	Therapiestudie	60
2.8.4	Histopathologische Untersuchungen an Gewebeschnitten	63
3	Ergebnisse	64
3.1	Struktur-Aktivitäts-Beziehungen	64
3.1.1	Thiazolidin-Cluster	66
3.1.2	Benzhydrylpiperidinamin-Cluster	68
3.1.3	Imidazol-Cluster	70
3.1.4	Phenotiazin-Cluster	72
3.1.5	Tetrahydrocarbazol-Cluster	74

3.2 Dosis-Wirkungs-Beziehungen.....	76
3.2.1 Modulation der Freisetzung von Kalzium aus dem ER.....	76
3.2.2 Modulation des mitochondrialen Membranpotentials	78
3.2.3 Modulation von A β -Peptid Spiegeln	80
3.3 Akute Toxizität und pharmakokinetische Eigenschaften	84
3.3.1 Einfluss auf die Glutamattoxizität.....	84
3.3.2 Bestimmung der LD ₅₀	85
3.3.3 Versuche zur Frage der Wirkstoffapplikation	86
3.3.4 Versuche zur Frage der Resorption	90
3.4 Therapiestudie mit gea_133	92
3.4.1 Einfluss auf Plaquegröße und –dichte	93
3.4.2 Histopathologische Untersuchung.....	97
4 Diskussion	99
4.1 Arzneimittelforschung	99
4.2 Arzneimittelforschung bei Morbus Alzheimer	101
4.2.1 Mechanismus.....	102
4.2.2 Stand der Entwicklung von neuen Therapieansätzen.....	103
4.2.3 Morbus Alzheimer ist eine chronisch progressive Erkrankung.....	105
4.2.4 Der Verlust von Synapsen ist nicht reversibel	106
4.3 High-Throughput-Screening	107
4.3.1 Allgemein	107
4.3.2 Kalzium-Screen	108
4.4 Target-Identifizierung	109
4.5 Tetrahydrocarbazole.....	110
4.5.1 Modulation der Freisetzung von Kalzium aus dem ER.....	110
4.5.2 Modulation des mitochondrialen Membranpotentials	111
4.5.3 Modulation von A β -Peptid Spiegeln	112
4.5.4 Versuche in vivo.....	112
4.5.5 Fazit	115
5 Zusammenfassung.....	116
6 Literatur	118
7 Eigene Veröffentlichungen	140

8	Anhang.....	141
8.1	Kommerziell verfügbare Carbazole	141
8.2	Synthetisierte Carbazole	146
8.3	Danksagung	149

Abbildungsverzeichnis

Abb. 1: Originalaufnahme eines Hirnschnittes von Auguste Deter.....	13
Abb. 2: Nicht-amyloidogene und amyloidogene APP-Prozessierung.....	16
Abb. 3: Mutationen des Amyloid-Vorläuferproteins.....	17
Abb. 4: Topologisches Modell für Präsenilin 1	18
Abb. 5: Verfügbare Acetylcholinesterasehemmer.....	23
Abb. 6: NMDA-Rezeptor Antagonist Memantin	24
Abb. 7: Auswahl einiger unselektiver γ -Sekretase-Inhibitoren	28
Abb. 8: Auswahl selektiver γ -Sekretase-Inhibitoren	28
Abb. 9: Der BACE-Inhibitor LY2811376	30
Abb. 10: Die A β -Aggregationsinhibitoren Tramiprosat und ELND005	31
Abb. 11: Yellow Cameleon 3.6	35
Abb. 12: Schematischer Überblick über die Messung der Freisetzung von Kalzium aus dem endoplasmatischen Retikulum im Hochdurchsatz und die Datenanalyse	37
Abb. 13: Darstellung einer mit der Software DataMiner erstellten SAR-Karte	40
Abb. 14: Tetramethylrhodaminmethylester (TMRM)	41
Abb. 15: Reduktion des Tetrazoliumsalzes (MTT) zum Formazan	47
Abb. 16: OECD Test No. 423: Acute Oral Toxicity	50
Abb. 17: Repräsentative Bilder der mit Wirkstoff versetzten Gelatine.....	53
Abb. 18: GC-MS-Chromatogramm von gea_133.....	59
Abb. 19: Cluster aus dem primären Kalziumscreen mit den 5 identifizierten Leitstrukturen.....	65
Abb. 20: Vertreter der Leitstruktur der Thiazolidine.....	66
Abb. 21: Generische Strukturformel von patentierten TNF-Inhibitoren	67
Abb. 22: Vertreter der Leitstruktur der Benzhydrylpiperidinamine.....	68
Abb. 23: Auswahl an Antihistaminika der ersten und zweiten Generation.....	69
Abb. 24: Die unselektiven Kalziumkanalhemmstoffe Fendilin und Fluspirilen	69

Abb. 25: Vertreter der Leitstruktur der Imidazole	70
Abb. 26: Auswahl an Antimykotika mit Imidazol-Grundstruktur.....	70
Abb. 27: Patentierte generische Strukturformel von Imidazolen für die Therapie von Krankheiten des ZNS.....	71
Abb. 28: Vertreter der Leitstruktur der Phenothiazine	72
Abb. 29: Auswahl von Neuroleptika des Phenothiazin-Typs.....	73
Abb. 30: Carbazole aus der DIVERSet-Substanzbibliothek	74
Abb. 31: Die 4 weiter analysierten Vertreter der Tetrahydrocarbazolamine.....	76
Abb. 32: Effekt von Tetrahydrocarbazolaminen auf den Ausstrom von Kalzium aus dem ER	77
Abb. 33: Effekt von Tetrahydrocarbazolaminen auf das mitochondriale Membranpotential.....	78
Abb. 34: Effekt von Tetrahydrocarbazolaminen auf die Spiegel unterschiedlich langer A β -Peptide	80
Abb. 35: Effekt von Tetrahydrocarbazolaminen auf das Verhältnis von A β 42/40	82
Abb. 36: Glutamattoxizität in primären Nervenzellkulturen von PS1(A246E)-Mäusen	85
Abb. 37: Körpergewicht von C57/Bl6 Mäusen während der Toxizitätsstudie.....	86
Abb. 38: ALZET [®] Pumpen nach Explantation aus dem Versuchstier	89
Abb. 39: Konzentration von gea_133 in Blut und Gehirn von C57/Bl6 Mäusen.....	91
Abb. 40: Therapieplan für gea_133 an transgenen Mäusen	93
Abb. 41: Einfluss von gea_133 auf die Plaquegröße und -dichte in APPPS1 Δ E9-Mäusen	95
Abb. 42: Einfluss von gea_133 auf die Plaquegröße und -dichte in APPPS1-Mäusen..	96
Abb. 43: Repräsentative histologische Präparate unterschiedlicher Organe eines Tieres der Kontrollgruppe.....	97
Abb. 44: Repräsentative histologische Präparate unterschiedlicher Organe eines Tieres der Versuchsgruppe	98
Abb. 45: Vertreter der kommerziell erworbenen Carbazole.....	145
Abb. 46: Vertreter der von André Gehring synthetisierten Carbazole	148

Tabellenverzeichnis

Tab. 1: Schweregradeinteilung nach MMST-Punktwertung	22
Tab. 2: Eigenschaften und Dosierung von Cholinesterasehemmern	23
Tab. 3: Eigenschaften von Memantin	25
Tab. 4: Mittlere effektive Konzentrationen (EC_{50}) der Tetrahydrocarbazolamine auf das mitochondriale Membranpotential.....	79
Tab. 5: Mittlere inhibitorische Konzentrationen (IC_{50}) auf die Spiegel von A β -Peptiden unter Inkubation mit Tetrahydrocarbazolaminen	81

Abkürzungsverzeichnis

°C	Grad Celsius
Abb.	Abbildung
A β	Amyloid- β , Abeta
ACh	Acetylcholin
AChE	Acetylcholinesterase
AD	Alzheimer Demenz
ApoE4	Apolipoprotein E ϵ 4-Allel
APP	Amyloid Precursor Protein, Amyloid-Vorläufer-Protein
APPPS1	Transgenes Mausmodell mit der schwedischen Doppelmutation (KM \rightarrow NL) und einer zusätzlichen PS1-Mutation (L166P)
BSA	Bovines Serum Albumin
CCh	Carbachol
COX	Cyclooxygenase
CYP	Cytochrom P
d	Days, Tag(e)
DIV	Days in vitro, Tage in Kultur
DMEM	Dulbecco's modified eagle medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
ER	Endoplasmatisches Retikulum
FAD	Familiäre Alzheimer Demenz
FBS	Fetal bovine serum, fötales Rinderserum
FRET	Förster-Resonanz-Energie-Transfer
h	Hour, Stunde(n)

HBSS	Hank's balanced salt solution
HEK	Human embryonic kidney, menschliche embryonale Nierenzellen
i.p.	intraperitoneal
IP ₃	Inositol-1,4,5-triphosphat
IQWiG	Institut für Qualität und Wirtschaftlichkeit im Gesundheitswesen
LTP	Long term potentiation, Langzeitpotenzierung
min	Minute(n)
mL	Milliliter
mM	millimolar
μl	Mikroliter
μM	mikromolar
NSAID	Non steroidal antiinflammatory drug, Nichtsteroidales Antirheumatikum
PBS	Phosphate buffered saline, Phosphat gepufferte Kochsalzlösung
PDL	Poly-D-Lysin
PEG	Polyethylenglykol
PFA	Paraformaldehyd
PS1, 2	Präsenilin 1, 2
S182	Mausmodell mit unverändertem humanen PS1
s.c.	subkutan
YC 3.6	Yellow cameleon 3.6

1 Einleitung

Mit der immer höher werdenden Lebenserwartung der Bevölkerung in den Industrienationen steigt gleichzeitig auch der Hauptrisikofaktor für Demenzerkrankungen, das Alter (1). Die Demenz ist eine chronische und meist progressive Fehlfunktion des Gehirns und führt zu einer Verschlechterung der kognitiven Funktionen, gekennzeichnet durch Störungen des Gedächtnisses, des Denkvermögens und der emotionalen Kontrolle. Zusätzlich kommt es zu einer Beeinträchtigung von Aktivitäten des täglichen Lebens, welche mit einem Verlust sowohl von Alltagskompetenzen wie der zeitlich-örtlichen Orientierung, der Kommunikationsfähigkeit und der autobiographischen Identität, als auch von Persönlichkeitsmerkmalen einhergeht. Parallel dazu entwickeln sich meist psychopathologische Symptome. Als wichtigste sind hier Apathie, Depression, Agitiertheit, Ängstlichkeit, Schlafstörungen und paranoide Symptome zu nennen. Das Wort Demenz kommt vom lateinischen *demens*, welches sich aus dem Präfix *de* (miss-, fort-, weg-) und dem Wort *mens* (Verstand, Denkvermögen) zusammensetzt. Alleine in Deutschland wird die Zahl der Neuerkrankungen an Demenz pro Jahr auf über 244.000 geschätzt (2). Die Wahrscheinlichkeit eine Demenz zu entwickeln verdoppelt sich ab einem Alter von 65 Jahren alle 5 Altersjahre und steigt auf mehr als 30 Prozent bei den über 90-jährigen (3). Etwa zwei Drittel aller Demenzerkrankungen entfallen auf Morbus Alzheimer (4).

1.1 Morbus Alzheimer

Der deutsche Psychiater und Neuropathologe Alois Alzheimer beschrieb das Krankheitsbild erstmals bei einem Vortrag auf der Versammlung südwestdeutscher Irrenärzte in Tübingen im November 1906 anhand seiner Patientin Auguste Deter (5). Die Patientin litt unter Gedächtnisverlust, Desorientierung, Halluzinationen und Wahnvorstellungen (6). Nach ihrem Tod entdeckte Alzheimer in ihrem Gehirn spezifische Ablagerungen, sogenannte Plaques und Neurofibrillen (vgl. Abb. 1, Seite 13).

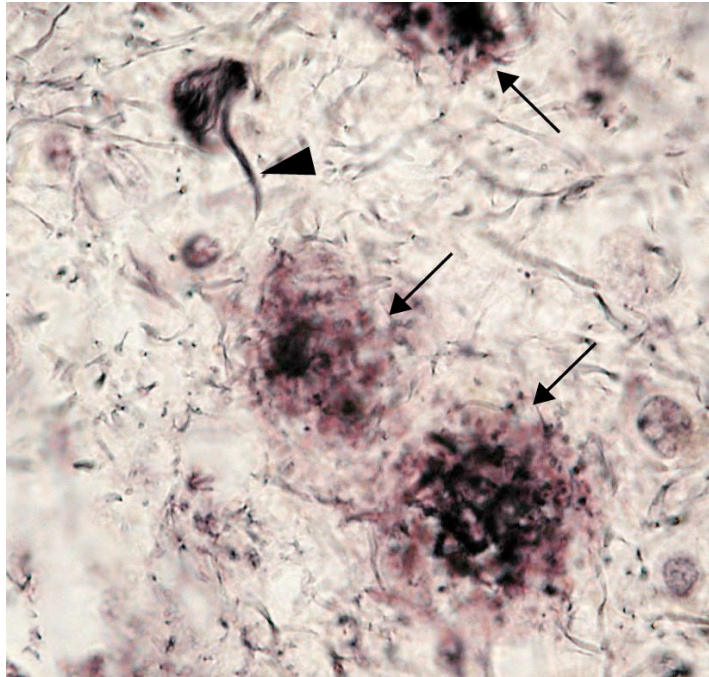


Abb. 1: Originalaufnahme eines Hirnschnittes von Auguste Deter

Gezeigt sind Neurofibrillenbündel (Pfeilspitze) sowie neuritische Amyloid-Plaques (Pfeile).

(Silberfärbung aus den Archiven des Zentrums für Neuropathologie und Prionforschung, München).

Ihre berühmteste und zugleich für die Erkrankung stark charakteristische Aussage war: „*Ich habe mich sozusagen selbst verloren*“ (7). Emil Kraepelin prägte ab dem Jahr 1910 den Begriff Morbus Alzheimer für diese neu entdeckte Erkrankung des Gehirns (8). Mittlerweile ist Morbus Alzheimer nach Herz-Kreislauf-Erkrankungen, Krebs und Schlaganfällen die vierthäufigste Todesursache weltweit. Die wichtigsten Risikofaktoren der Erkrankung sind Alter (9), Geschlecht (10), eine positive Familienanamnese und das Vorhandensein des $\epsilon 4$ -Allels des Apolipoprotein E (11).

Es werden zwei verschiedene Formen von Morbus Alzheimer unterschieden, die senile und die präsenile Form. Bei der senilen, sporadischen Form manifestieren sich klinische Symptome meist ab einem Alter von 65 Jahren. Im Gegensatz dazu tritt die präsenile Form bereits bedeutend früher auf und hat viel zu unserem heutigen Verständnis der Krankheit beigetragen. Diese relativ seltene Form der Erkrankung ist durch familiär übertragbare genetische Mutationen bedingt und betrifft etwa 1% der Alzheimer-Patienten (12, 13). Weltweit sind etwa 30 Millionen Menschen von der präsenilen und senilen Form des Morbus Alzheimer betroffen. Schätzungen zu Folge wird sich diese

Zahl auf Grund des demografischen Wandels unserer Gesellschaft bis ins Jahr 2050 vervierfachen (14).

1.1.1 Histopathologie des Morbus Alzheimers

Die Krankheit ist durch charakteristische neuropathologische Schädigungen, wie Hirn-atrophie und Synapsenverlust in Gehirnregionen, die für die intellektuelle Leistungsfähigkeit verantwortlich sind, definiert (15). Von dieser Degeneration der Nervenzellen und Synapsen ist vor allem der Kortex und Hippocampus betroffen. Kennzeichnend für Morbus Alzheimer zu Beginn der Krankheit ist der Ausfall des episodischen Gedächtnisses. Zusätzlich kommt es zu den bereits von Alzheimer identifizierten Ablagerungen im Gehirn. Während sich A β -Plaques außerhalb der Nervenzellen befinden, kommt es intrazellulär zu der Ablagerung des hyperphosphorylierten Proteins Tau (neurofibrilläre Bündel, *tangles*). Die progressive Ablagerung von A β -Peptiden im Gehirn und an den Wänden von meningealen und zerebralen Blutgefäßen gehen den manifesten kognitiven Störungen häufig um viele Jahre voraus (13). Neurofibrilläre Bündel, Nervenzellverlust und Synapsenuntergang entwickeln sich dagegen parallel zum kognitiven Verfall (16). Insbesondere bei fortschreitender Pathologie scheinen darüber hinaus oxidativer Stress und entzündliche Vorgänge zu weiteren Hirngewebsbeschädigungen beizutragen.

1.1.1.1 Amyloid Plaques

Amyloide Plaques stellen eines der histopathologischen Hauptmerkmale des Morbus Alzheimer dar. Bereits 1984 wurde der Hauptbestandteil der A β -Peptid Plaques, ein 4 kDa großes A β -Peptid, identifiziert (17). A β -Peptide entstehen als proteolytisches Spaltprodukt aus dem Vorläuferprotein APP (*Amyloid precursor protein*) (18). Plaques sind als diffuse Ablagerungen bereits viele Jahre vor Manifestation der Erkrankung im Gehirn nachzuweisen. Histopathologisch werden zwei verschiedene Arten von Plaques, die „diffusen“ und die „nicht-diffusen“ unterschieden.

„Nicht-diffuse Plaques“ bestehen vor allem aus fibrillären Amyloidablagerungen mit einem kompakten Kern. In diesen finden sich mit zunehmendem Krankheitsverlauf vermehrt Ausläufer degenerativ veränderter Neurone, sogenannte dystrophe Neuriten. Plaques sind typischerweise von reaktiven Astrozyten, aktivierten Mikroglia und molekularen Entzündungsindikatoren umgeben. Daher werden sie auch fibrilläre Plaques

genannt. Ihr Auftreten wird mit Synapsenverlust und kognitiver Beeinträchtigung verbunden und somit unter anderem für die Diagnose der Krankheit verwendet (19, 20).

„Diffuse Plaques“ dagegen sind eher amorphe Amyloidablagerungen (16). Da diese auch bei gesunden älteren Personen auftreten werden sie alternativ als senile Plaques bezeichnet. Sie weisen keine neuritischen Dystrophien auf und können nicht mit dem Verlust von Synapsen und kognitiver Beeinträchtigung assoziiert werden. Dementsprechend werden sie nicht für die Diagnose herangezogen (19).

1.1.1.2 Neurofibrillenbündel

Ein weiteres wichtiges Merkmal der Erkrankung stellen die abnormen, intrazellulären Ablagerungen des Proteins Tau dar. Tau ist ein Mikrotubuli assoziiertes Protein (MAPT), das physiologischerweise am Axon lokalisiert ist und dort den axonalen Transport durch Bindung und Stabilisation der Mikrotubuli unterstützt. Infolge der bei Morbus Alzheimer auftretenden Hyperphosphorylierung von Tau kommt es zu einer Beeinträchtigung des axonalen Transports. Tau, das auf Grund dieser Hyperphosphorylierung nicht mehr an Mikrotubuli binden kann, wird in das somatodendritische Kompartiment verlagert und aggregiert dort zu intraneuronalen Bündeln, sogenannten *neurofibrillary tangles* (NFT) (21). Die Störung axonaler und dendritischer Transportmechanismen und das Auftreten dieser Bündel führen höchstwahrscheinlich zum Untergang von Neuronen (22). Dies korreliert mit dem kognitiven Verfall und wird daher als diagnostischer Marker verwendet (23). Abnorme Tau-Aggregate kommen allerdings auch bei anderen Erkrankungen, sogenannten Tauopathien vor. Dazu zählen zum Beispiel die Frontotemporale Demenz (FTDP-17) oder Morbus Pick. Im Gegensatz zu Morbus Alzheimer treten bei diesen jedoch keine Ablagerungen von A β -Peptiden auf.

1.1.1.3 Verlust von Neuronen und Synapsen

Neurone und Synapsen bilden das strukturelle und funktionelle Grundgerüst des Gehirns. Bei Alzheimer-Patienten ist die Anzahl der Neuronen im Locus caeruleus (24), Kortex und der CA1-Region des Hippocampus im Vergleich zu gesunden Personen erniedrigt (25). Die Schädigung der Synapsen tritt bereits bedeutend früher auf und betrifft vor allem den Kortex und den Hippocampus (26, 27). Der Verlust von Synapsen

im Hippocampus wird als das morphologische Korrelat des Gedächtnisverlust beim Morbus Alzheimer verstanden (28).

1.1.2 Amyloid-Vorläuferprotein (APP)

Das Amyloid-Vorläuferprotein ist ein integrales, transmembranäres Protein. Die Isolierung der zugehörigen genetischen Information auf Chromosom 21 gelang 1987 (18, 29, 30). So lässt sich auch die Tatsache erklären, dass Menschen mit Down-Syndrom (Trisomie 21), die 3 anstatt 2 Kopien des Chromosoms 21 besitzen vermehrt APP produzieren. Als Folge dessen treten hier bereits ab dem 30. Lebensjahr starke Akkumulierungen von A β -Plaques und Neurofibrillen auf, was zu einem frühen Ausbruch von Morbus Alzheimer führt (31). Die Spaltung von APP wird entweder durch die α -Sekretase oder durch die β -Sekretase (memapsin 2; BACE-1) eingeleitet und führt zu der Generierung der löslichen Ektodomänen APPs α oder APPs β . Die C-terminalen Fragmente C83 und C99 werden anschließend durch die γ -Sekretase geschnitten, wobei AICD (APP intrazelluläre Domäne) und entweder p3 oder Abeta entsteht (32) (vgl. Abb. 2, Seite 16).

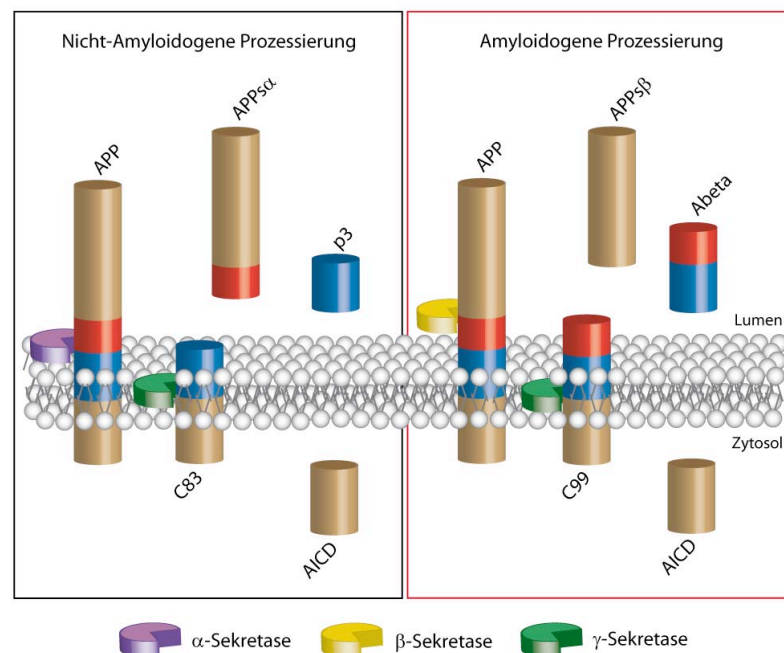


Abb. 2: Nicht-amyloidogene und amyloidogene APP-Prozessierung

Bei der nicht-amyloidogenen Spaltung wird APP durch die α -Sekretase zu APPs α und C83 gespalten. C83 wird durch γ -Sekretase zu p3 und AICD prozessiert. Beim amyloidogenen Weg spaltet die β -

Sekretase APP zu APPs β und C99. C99 wird anschließend durch die γ -Sekretase zu Abeta und AICD gespalten.

Die γ -Sekretase ist ein Membranproteinkomplex der aus Präsenilin, Nicastrin, aph-1 („*anterior pharynx-defective phenotype*“) und pen-2 („*presenilin enhancer*“) im Verhältnis 1:1:1:1 besteht. Für die ordnungsgemäße Funktion der γ -Sekretase sind alle 4 Proteine notwendig (33). APP besitzt zwei nahe Verwandte, APLP (*amyloid precursor like protein*) -1 und -2. APLP-1 und -2 sind wichtige Modulatoren der Glukose- und Insulinhomöostase (34). Interessanterweise werden APP und APLP-1 und -2 auf die gleiche Art und Weise durch α -, β - und γ -Sekretasen prozessiert, obwohl nur APP die A β -Region aufweist (35).

Mit Hilfe von Untersuchungen an Familien mit der familiären Form von Alzheimer konnte gezeigt werden, dass Mutationen in Präsenilin 1, 2 und in APP mit nahezu hundertprozentiger Wahrscheinlichkeit zum Ausbruch von Morbus Alzheimer führen.

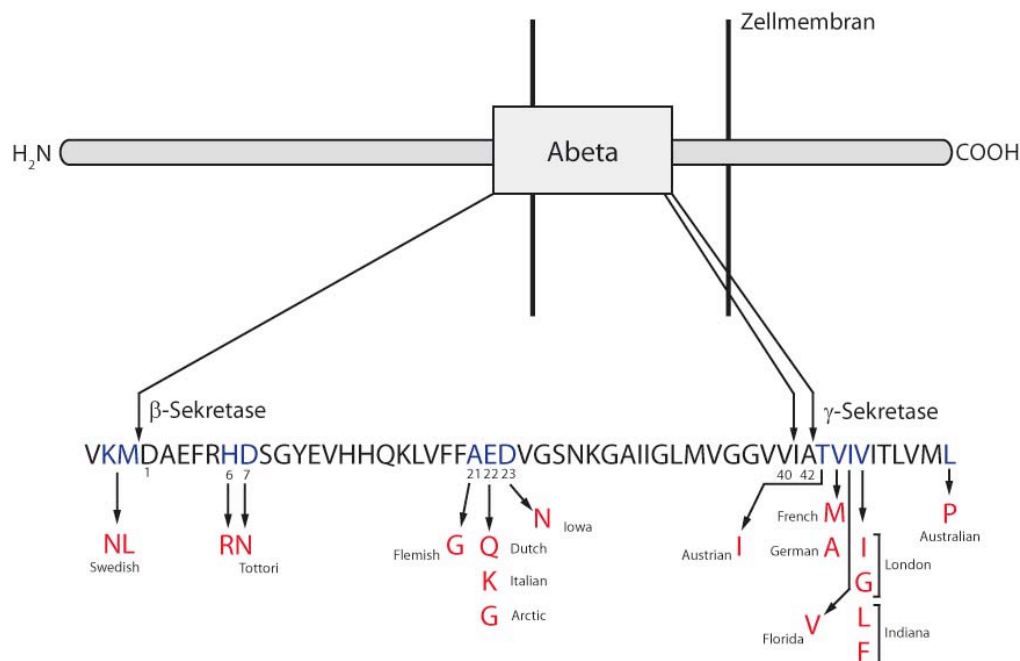


Abb. 3: Mutationen des Amyloid-Vorläuferproteins

Dargestellt sind die wichtigsten Mutationen von APP, die zu familiären Formen von Morbus Alzheimer führen. Durch Spaltung mit β - und γ -Sekretasen entsteht A β . Aminosäuren, für die Punktmutationen identifiziert wurden, die zu den vererbaren Formen von Morbus Alzheimer führen, sind blau markiert. In rot sind jene Aminosäuren angegeben, die die blau markierten ersetzen. Zusätzlich ist jeweils der englische Name der Mutation genannt (36).

Heute sind 24 Mutationen in APP bekannt, die mit der familiären Form des Morbus Alzheimer assoziiert werden (11). Die Rolle der Präseniline bei Morbus Alzheimer wird im folgenden Kapitel dargestellt.

1.1.3 Präseniline

Präseniline sind Apsartylproteasen und als katalytische Untereinheit der γ -Sekretasen (37–39) für die Spaltung von APP verantwortlich (39). Die Kristallstruktur von Präsenilin konnte bisher noch nicht entschlüsselt werden. Momentan wird eine Struktur von 9 transmembranären Domänen (TMD), die auf der ER-Membran lokalisiert sind favorisiert (40) (vgl. Abb. 4, Seite 18).

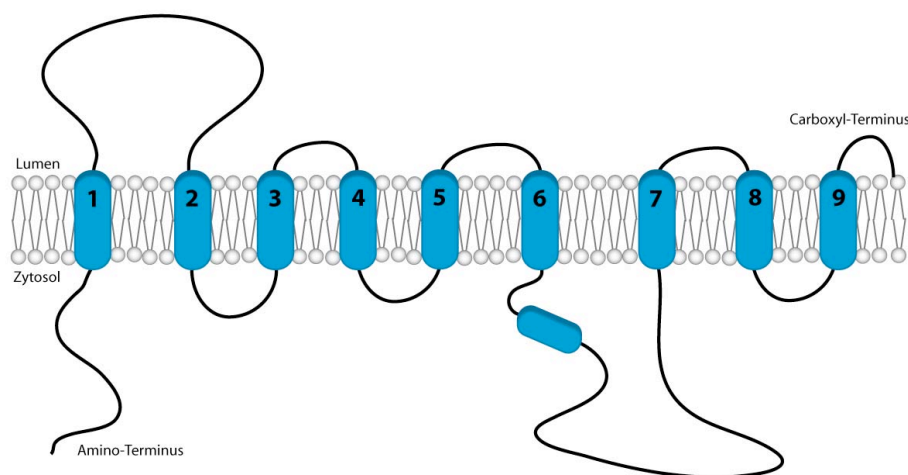


Abb. 4: Topologisches Modell für Präsenilin 1

Ein 9-TMD-Modell von PS1, wobei der Amino-Terminus und die große hydrophile Schleife ins Zytosol und der Carboxyl-Terminus in das Lumen ragen. Modifiziert nach (40)

Für die endoproteolytische Spaltung von Proteinen fügt sich Präsenilin in den γ -Sekretase-Proteinkomplex ein, welcher anschließend zur Zellmembran transportiert wird (41). γ -Sekretasen sind in der Lage $A\beta$ -Peptide in einer Länge von 37 bis 46 Aminosäuren zu schneiden. 1995 konnten erstmals mehrere familiäre Alzheimer Mutationen zunächst für Präsenilin 1 (PS1) auf Chromosom 14 (42) und kurz darauf für Präsenilin 2 (PS2) auf Chromosom 1 (43) nachgewiesen werden. Bis heute wurden 185 Mutationen für PS1 und PS2 identifiziert (11). Diese Mutationen haben gemein, dass sie das Ver-

hältnis von A β 42/A β 40 in Richtung des toxischeren A β 42 verschieben (44). Daher sind die Präseniline ein interessantes Zielmolekül für die Wirkstoffentwicklung der Pharmaindustrie.

Die enzymatische Aktivität der γ -Sekretase ist jedoch nicht spezifisch für APP. Bisher konnten neben APP noch 60 weitere Proteine als Substrat für die γ -Sekretase identifiziert werden (45). So besitzen Präseniline unter anderem eine zentrale Rolle in der Prozessierung des Rezeptors Notch durch γ -Sekretasen (38, 46). Der Notch-Signalweg ist an vielen Zelldifferenzierungsprozessen beteiligt und spielt somit eine wichtige Rolle bei der Embryogenese und Entwicklung (47). Daraus resultieren sehr wahrscheinlich auch die starken Nebenwirkungen wie gastrointestinale Toxizität (48) und Immunsuppression der ersten, unselektiven γ -Sekretase Inhibitoren. Ein Beispiel ist der Wirkstoff LY450139 von Eli Lilly, dessen weitere klinische Untersuchung gestoppt werden musste (49). Präseniline besitzen zusätzlich noch weitere, nicht proteolytische Funktionen. Dazu zählen unter anderem der Transport und Umsatz von Proteinen, sowie die Beeinflussung des Kalziumhaushaltes der Zelle (50).

1.1.4 Kalzium, Mitochondrien und Morbus Alzheimer

Kalzium

Kalzium ist einer der wichtigsten intrazellulären Botenstoffe im Gehirn und an der Entwicklung von Neuronen, synaptischer Übertragung und der Regulation verschiedenster Signalkaskaden beteiligt (51). Die extrazelluläre Kalziumkonzentration (1-2 mM) ist um ein vielfaches höher als im Zytosol (50-200 nM). Im endoplasmatischen Retikulum (ER), welches unter anderem als intrazellulärer Kalziumspeicher dient, liegt die Kalziumkonzentration wiederum auf dem Niveau des Extrazellularraumes (1-2 mM). Dieser Gradient wird über einen aktiven Transportmechanismus unter ATP-Verbrauch durch die sarkoendoplasmatische Retikulum-ATPase (SERCA) bewerkstelligt. Es gibt im Wesentlichen zwei Kalziumkanäle, die die Freisetzung von Kalzium aus dem ER regulieren: der Inositoltrisphosphatrezeptor (IP₃-R) und der Ryanodin-Rezeptor (RyR).

Zahlreiche wissenschaftliche Veröffentlichungen legen nahe, dass bereits lange vor Auftreten erster klinischer Symptome des Morbus Alzheimer eine Störung der neuronalen Kalziumhomöostase, zum Beispiel durch eine erhöhte IP₃-Rezeptor-Aktivität, vorliegt (52–54). Erhöhte intrazelluläre Kalziumkonzentrationen verändern

die Spaltung von APP, was zu erhöhten Spiegeln der A β -Peptide führt (55). Die Behandlung von HEK-Zellen mit dem Kalzium Ionophor A23187 führt ebenso wie die Applikation von Koffein über eine Erhöhung der zytosolischen Kalziumkonzentration zu einer Verdreifachung der Produktion von A β -Peptiden (55). Da eine Destabilisierung des zytosolischen Kalziumspiegels zu der Bildung von freien Radikalen, Lipidperoxidation und Apoptose führen kann, gilt es als wahrscheinlich, dass die Neurotoxizität von A β -Peptiden auf diesen Mechanismen beruht (56). Zudem konnte in Gehirnen von Alzheimer-Patienten eine erhöhte Kalziumkonzentration nachgewiesen werden (57). Es ist anerkannt, dass Präsenilinmutationen Einfluss auf die Kalziumspeicher des endoplasmatischen Retikulums haben (58). So konnte gezeigt werden, dass in Fibroblasten von FAD-Patienten die IP₃-Rezeptor vermittelte Freisetzung von Kalzium aus dem ER verstärkt ist (59). Diese erhöhte Freisetzung konnte auch *in vitro* gezeigt werden, so z.B. in Eizellen von *Xenopus laevis* (60), neuronalen Primärzellkulturen (61), in akut dissoziierten Neuronen (62) und in Hirnschnitten von transgenen Mäusen (63). Der zugrunde liegende Mechanismus konnte bisher noch nicht eindeutig entschlüsselt werden und wird kontrovers diskutiert. Eine Möglichkeit wäre, dass die verstärkte Expression von Ryanodin-Rezeptoren zu einem erhöhten Kalziumausstrom aus dem ER führt (61). Eine andere Theorie besagt, dass Präseniline physiologisch als Kalzium-Leckagekanäle im ER dienen. Mutationen von Präsenilinen sollen diese Funktion behindern und damit die Kalziumkonzentration im ER erhöhen (64). In Folge dessen erhöht sich die Menge an Kalzium, die aus dem ER nach Stimulation freigesetzt wird. Eine weitere Theorie besagt, dass Mutationen in Präsenilin zu einer Stimulation des IP₃-induzierten Kalziumausstromes führen. Dies geschieht im Wesentlichen über eine Erhöhung der Öffnungswahrscheinlichkeit von IP₃-Rezeptoren (60, 65).

Mitochondrien

Mitochondrien sind für die Bildung von ATP verantwortlich und regulieren damit die Energieversorgung der Zelle. ATP ist außerdem für die Erregbarkeit und das Überleben von Neuronen verantwortlich. Weitere wichtige Funktionen der Mitochondrien sind die Regulation des Kalziumsignals, der synaptischen Plastizität und der Kontrolle des programmierten Zelltodes (Apoptose) (66). Störungen der mitochondrialen Aktivität tragen zu neurodegenerativen Erkrankungen, wie Morbus Parkinson, Chorea Huntington und Morbus Alzheimer bei (67). Die Folgen einer beeinträchtigten Funktion der Mito-

chondrien sind vielfältig. In Gehirnen von Alzheimer-Patienten besteht eine Korrelation zwischen Störungen der mitochondrialen Aktivität und dystrophen Neuriten, dem Verlust der dendritischen Verzweigungen und pathologischen Veränderungen von dendritischen *spines* (68). Die Dysfunktion der Mitochondrien in Neuronen wird durch A β -Peptide zusätzlich verstärkt. A β -Peptide führen zu einer verstärkten Bildung von mitochondrialen Superoxiden, verminderter ATP-Bildung und einer erhöhten mitochondrialen Kalziumaufnahme (69). Pathologische Veränderungen der Kalziumhomöostase werden wiederum mit einer Störung der zellulären Energieproduktion durch Mitochondrien, sowie einer verstärkten A β -Peptid Bildung assoziiert (56). Die Unterstützung der physiologischen Funktion der Mitochondrien stellt somit einen wichtigen Angriffspunkt für die Entwicklung zukünftiger Medikamente in der Therapie des Morbus Alzheimer.

1.2 Medikamentöse Therapie des Morbus Alzheimer

Bevor ein Wirkstoff für die Therapie des Morbus Alzheimer in den USA oder Europa zugelassen wird, muss seine Wirksamkeit in einer Placebo kontrollierten Studie bewiesen werden. Neben einem positiven Nutzen auf die kognitive Leistung und das Verrichten von alltäglichen Aufgaben muss eine allgemeine klinische Verbesserung bei gleichzeitig angemessener Sicherheit nachgewiesen werden. Rein symptomatisch wirkende Substanzen werden im Rahmen von klinischen Studien in der Regel über einen Zeitraum von 6 Monaten, krankheitsmodifizierende Substanzen dagegen über 12-18 Monate untersucht (70). Kognitive Kurztests, wie zum Beispiel der Mini-Mental-Status-Test (MMST), der Test zur Früherkennung von Demenzen mit Depressionsabgrenzung (TFDD) oder der Uhrentest, dienen dabei als Verlaufskontrolle (71). Das Institut für Qualität und Wirtschaftlichkeit im Gesundheitswesen (IQWiG) empfiehlt als Basis für eine adäquate Therapie folgende Schweregradeinteilung für Demenzen vom Typ des Morbus Alzheimer anhand des MMST (Skala von 0-30) (72):

Schweregrad	Leichte AD	Mittelschwere AD	Schwere AD
Punkte	20-26	10-19	< 10

Tab. 1: Schweregradeinteilung nach MMST-Punktewertung

1.2.1 Vorhandene Therapiemöglichkeiten

In Deutschland stehen derzeit 3 Cholinesterasehemmer, Memantin und der Ginkgo biloba Extrakt (EGb 761[®]) für die Therapie des Morbus Alzheimer zur Verfügung (70). Jedoch ist keiner dieser Wirkstoffe in der Lage das Fortschreiten dieser Krankheit zu verhindern. Im Regelfall besitzen sie nur eine geringe, rein symptomatische und zeitlich limitierte Wirkung (73).

1.2.1.1 Acetylcholinesterasehemmer

Die erste Wirkstoffklasse, die eine Zulassung für die Therapie des Morbus Alzheimer erlangte ist die der Acetylcholinesterasehemmer (vgl. Abb. 5, Seite 23): Tacrin (1995), Donepezil (1996), Rivastigmin (1998) und Galantamin (2001). Wegen einer besonders kurzen Halbwertszeit und dem Auftreten von Lebertoxizität wird Tacrin heute nicht

mehr verwendet. Die drei später zugelassenen Wirkstoffe besitzen diese Nachteile nicht mehr.

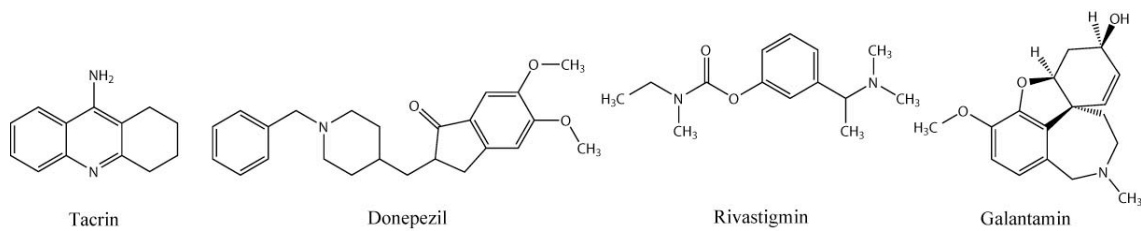


Abb. 5: Verfügbare Acetylcholinesterasehemmer

Acetylcholinesterasehemmer (AChE-I) hemmen das Enzym Acetylcholinesterase (AChE) und erhöhen über die Blockierung des Abbaus von Acetylcholin (ACh) dessen Konzentration im synaptischen Spalt. In Folge dessen wird die Wahrscheinlichkeit der Interaktion von ACh mit postsynaptischen cholinergen Rezeptoren erhöht. In Gehirnen von Patienten mit Morbus Alzheimer konnte eine verminderte cholinerge Innervation und ein Mangel an Acetylcholin gezeigt werden (74). Acetylcholinesterasehemmer entfalten ihre Wirkung also über eine Normalisierung des cholinergen Systems. Alle Acetylcholinesterasehemmer besitzen eine Zulassung für die Behandlung leichter bis mittelschwerer Formen des Morbus Alzheimer. Donepezil wird zusätzlich auch bei schweren Verlaufsformen der Krankheit eingesetzt.

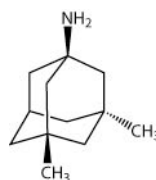
	Selektivität	HWZ	Einnahme	Metabolisierung	Dosis
Donepezil	Selektiver AChE-Inhibitor	70 h	1x täglich	CYP2D6 CYP3A4	Start 5mg → 10mg/d
Rivastigmin	AChE-I und Butyrylcholinesterase-Inhibitor	8 h	2x täglich	kaum über CYP metabolisiert	Start 2x1,5mg → 12mg/d
Galantamin	AChE-Inhibitor und allosterischer, nicotinerger Effekt	7 h	2x täglich	CYP2D6 CYP3A4	Start 2x4mg → 24mg/d

Tab. 2: Eigenschaften und Dosierung von Cholinesterasehemmern

Alle 3 Substanzen zeigen bei mittlerer und/oder hoher Dosis Hinweise auf eine günstige Beeinflussung der Therapieziele **Aktivitäten des täglichen Lebens** und **kognitive Leistungsfähigkeit**. Der **klinische Gesamteindruck** wird konsistent gebessert (72). Dennoch ist die therapeutische Wirksamkeit nur mäßig und verliert sich meist nach einer gewissen Behandlungszeit. Da die einzelnen Acetylcholinesterasehemmer keine relevanten Unterschiede hinsichtlich ihres klinischen Effektes aufweisen (75), orientiert sich die Auswahl des Wirkstoffes primär an dessen Neben- und Wechselwirkungsprofil. Die dosisabhängig auftretenden Nebenwirkungen lassen sich im Wesentlichen durch die Aktivierung des cholinergen Systems erklären. Neben gastrointestinalen Beschwerden wie Nausea, Emesis und Diarrhö ist auch die negativ chronotrope Wirkung der Acetylcholinesterasehemmer zu nennen. Daher ist diese Strukturklasse bei Vorliegen einer Bradykardie kontraindiziert (72).

1.2.1.2 NMDA-Rezeptor-Antagonist

Neben den Acetylcholinesterasehemmern steht mit Memantin (vgl. Abb. 6, Seite 24) ein Modulator der glutamatergen Neurotransmission für die Therapie des Morbus Alzheimer zu Verfügung. Glutamat ist der wichtigste exzitatorische Neurotransmitter im Gehirn, der mit Lernen, Gedächtnisprozessen und neuronaler Plastizität verbunden ist. Ein Überschuss führt jedoch zu einem massiven Einstrom von Kalzium in Nervenzellen, was letztendlich zum Absterben der entsprechenden Neuronen (Exzitotoxizität) führt. Memantin verdrängt als nicht kompetitiver NMDA-Rezeptor-Antagonist Kalium im NMDA-Rezeptor-Kanal, was den Eintritt von Kalzium in Neuronen durch den Rezeptor verhindert (70). Demnach soll Memantin die pathologischen Effekte des Glutamatüberschusses blockieren, ohne gleichzeitig die physiologischen Funktionen des Neurotransmitters zu unterdrücken.



Memantin

Abb. 6: NMDA-Rezeptor Antagonist Memantin

In vitro gibt es Hinweise, dass die Wirkung von Memantin nicht nur auf der Modulation der glutamatergen Neurotransmission beruht, sondern die Substanz zudem weitere neuroprotektive Eigenschaften aufweist. So konnte gezeigt werden, dass Memantin die Anzahl an Plaques und die Hyperphosphorylierung von Tau verringert (76). Zusätzlich konnte in hippocampalen Schnitten (Sprague Dawley-Ratten) gezeigt werden, dass Memantin in der Lage ist eine gestörte Langzeitpotenzierung (engl. *long-term potentiation*, LTP) wiederherzustellen (77). Die Langzeitpotenzierung ist eine Form der synaptischen Plastizität, die als ein physiologisches Korrelat von Lernen und Gedächtnis verstanden wird (78). Bisher ist jedoch unklar, ob die *in vitro* beobachteten neuroprotektiven Effekte von Memantin auch für die Besserung der klinischen Symptomatik verantwortlich sind.

	HWZ	Einnahme	Metabolisierung	Dosis
Memantin	60-80 h	2x täglich	Keine CYP-Metabolisierung	Start 5mg/d → 2x10mg/d

Tab. 3: Eigenschaften von Memantin

Die Wirksamkeit von Memantin auf die **Aktivitäten des täglichen Lebens** und die **kognitive Leistungsfähigkeit** konnte in klinischen Studien bewiesen werden. Zusätzlich ist Memantin in der Lage den **klinischen Gesamteindruck** bei Patienten mit mittelschweren bis schweren Formen des Morbus Alzheimer zu verbessern (MMST<15) (79). Erstaunlicherweise zeigte Memantin bei Patienten mit leichten Verlaufsformen der Krankheit keine Wirksamkeit auf die Aktivitäten des täglichen Lebens und nur einen geringen Effekt auf die kognitive Leistungsfähigkeit. Eine Behandlung mit Memantin bei Patienten mit leichter Alzheimer-Demenz wird daher nicht empfohlen (80). Die gleichzeitige Gabe von Memantin mit Donepezil (*off-label-use*) zeigte in einer Studie mit sehr schweren Verlaufsformen des Morbus Alzheimer (MMST: 5-9) eine verbesserte Wirkung im Vergleich zu Einzelgabe (81). Memantin besitzt günstige pharmakokinetische Eigenschaften. So wird die Bioverfügbarkeit von Memantin durch Nahrungsaufnahme nicht beeinflusst. Außerdem wird Memantin nicht von CYP-Enzymen metabolisiert. Da Alzheimer-Patienten auf Grund ihres Alters oftmals multimorbid sind, ist dies ein bedeutsamer Vorteil, da Wechselwirkungen mit anderen Medikamenten, die

das CYP-System beeinflussen nicht gegeben sind. Memantin wird über die Niere ausgeschieden, weswegen Dosisanpassungen lediglich bei Patienten mit Nierenfunktionsstörungen notwendig sind. Die häufigsten Nebenwirkungen von Memantin sind Kopfschmerzen, Vertigo und Somnolenz (79).

1.2.1.3 Ginkgo biloba Extrakt EGb 761[®]

Neben den Acetylcholinesterasehemmern und Memantin besitzt der Ginkgo-Spezialextrakt EGb 761[®] (Tebonin[®]) eine Zulassung für die Behandlung von Demenzen. Durch das Herstellverfahren von EGb 761[®] werden pharmakologisch relevante Inhaltsstoffe, wie Ginkgoflavon-Glykoside (22-27%) und Terpenlactone (5-7%) angereichert. Ginkgo-Spezialextrakte wirken multifaktoriell. Neben antioxidativen und neuroprotektiven Eigenschaften sind Effekte auf die Neurotransmission beschrieben. Zusätzlich wird eine Erhöhung der Cholinaufnahme und eine Verbesserung der Fließeigenschaften des Blutes diskutiert (82). Die zugelassenen Indikationen sind hirnorganische Leistungsstörungen bei demenziellen Syndromen mit Gedächtnis- und Konzentrationsstörungen, Vertigo, Tinnitus und Kopfschmerzen (83). Als Nebenwirkungen werden gelegentlich auftretende gastrointestinale Beschwerden und Kopfschmerzen genannt (83). In einer Metastudienanalyse hat das Institut für Qualität und Wirtschaftlichkeit im Gesundheitswesen die tägliche Gabe von 240 mg Ginkgo-Spezialextrakt EGb 761[®] untersucht und dabei einen Nutzen für die **Aktivitäten des täglichen Lebens** feststellen können. Basierend auf der recht heterogenen Studienlage gibt das IQWiG dennoch keine Empfehlung für die Verwendung des Ginkgo-Spezialextrakts EGb 761[®] bei Morbus Alzheimer (84). In einer weiteren Studie wurde die Langzeitanwendung des Ginkgo-Spezialextrakts EGb 761[®] als Prävention gegen Morbus Alzheimer untersucht. Es konnte jedoch kein signifikanter Nutzen nachgewiesen werden (85).

1.2.2 Medikamente in der Entwicklung

Die Beschreibung des ersten Alzheimer-Patienten durch Alois Alzheimer liegt mehr als 100 Jahre zurück. Dennoch sind bis heute keine krankheitsmodifizierenden Medikamente für die Therapie des Morbus Alzheimer verfügbar (80). Die auf dem Markt vorhandenen Medikamente zeigen zudem nur eine zeitlich begrenzte Wirkung (86). Daher

wird weiterhin mit Hochdruck an der Entwicklung neuer, wirkungsvollerer Medikamente geforscht.

1.2.2.1 γ -Sekretase Inhibitoren und Modulatoren

Die γ -Sekretase ist wegen ihrer Schlüsselposition in der Pathogenese des Morbus Alzheimer schon lange eines der wichtigsten Zielmoleküle bei der Entwicklung neuer Medikamente für die Therapie von Morbus Alzheimer. Die erste Strukturklasse für die eine inhibierende Wirkung auf die γ -Sekretase nachgewiesen werden konnte sind Hydroxyethylamine. Der wirksamste Vertreter dieser Klasse ist L-685,458 (Abb. 7, Seite 28). Ein weiteres Molekül mit hemmender Wirkung auf die γ -Sekretase ist der Peptidbasierte Inhibitor DAPT (Abb. 7, Seite 28). Dieses Dipeptidanalogen wurde im Rahmen einer Struktur-Aktivitäts-Optimierung im Anschluss an ein Hochdurchsatzscreening identifiziert. Es konnte nachgewiesen werden, dass DAPT die Spiegel von A β -Peptiden *in vitro* und auch in Gehirnen von APP transgenen Mäusen senken kann (87). Heute wird DAPT als wichtiges Werkzeug in der Forschung eingesetzt. Die konsequente Weiterentwicklung von DAPT führte zu noch wirksameren Substanzen, wie Compound E (88), LY-411,575 (89) und LY-450,139 (90) (Abb. 7, Seite 28). LY-450,139 (Semigacestat) wurde erfolgreich in Phase-I und -II klinischer Studien getestet. In Phase-III musste die Studie jedoch wegen starker Nebenwirkungen, wie gastrointestinaler Toxizität, Immunsuppression, Hautkrebs (48, 89) und zusätzlich mangelnder Wirkung im Vergleich zu Placebo gestoppt werden (49, 91). Das therapeutische Potential dieser unselektiven γ -Sekretase-Inhibitoren (vgl. Abb. 7, Seite 28) ist eingeschränkt, da die γ -Sekretase eine wichtige Rolle in der Signalkaskade des Notch Rezeptors spielt (38, 46) und die beobachteten Nebenwirkungen höchstwahrscheinlich auf die Störung dieser Signalkaskade zurückzuführen sind.

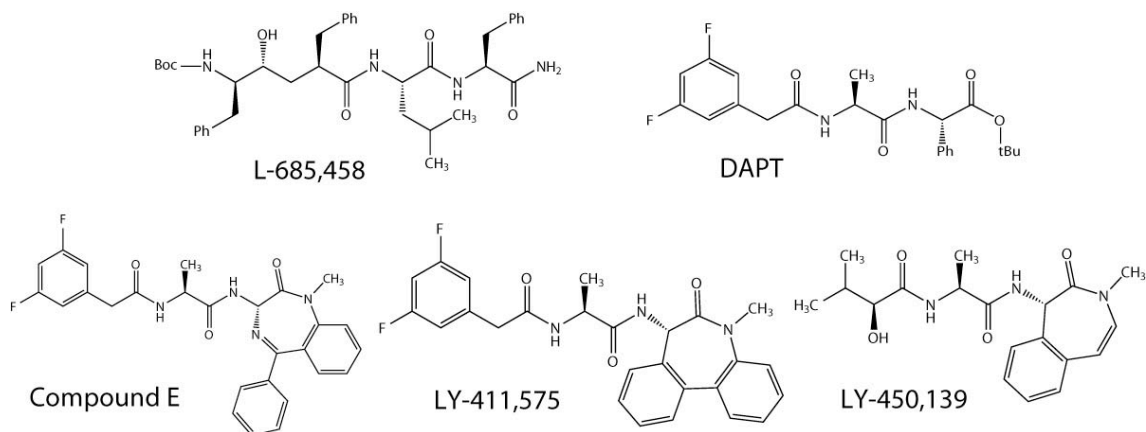


Abb. 7: Auswahl einiger unselektiver γ -Sekretase-Inhibitoren

Das Ziel der darauf folgenden Wirkstoffforschung war die Entwicklung selektiver γ -Sekretase-Inhibitoren (GSI), die keinen Einfluss auf die Notch Spaltung besitzen. Die erste Verbindung dieser Klasse ist der kompetitive Kinaseinhibitor Imatinib (Novartis) (92). Dieser Wirkstoff, der ursprünglich der Krebstherapie entstammt, ist in der Lage die Anzahl an Plaques in Mäusen zu vermindern. Im Anschluss an dessen Entdeckung wurden weitere, potentere Wirkstoffe, wie GSI-953 (Begacestat; Wyeth (93)) oder BMS-708163 (Avagacetat, Bristol-Myers-Squibb (94)) identifiziert (vgl. Abb. 8, Seite 28). Begacestat besitzt eine 15-fach höhere Selektivität für die Spaltung von APP im Vergleich zu Notch. Dieser Wirkstoff vermindert die Menge an A β -Peptiden in Tg2576-Tieren signifikant (93). Die Begacestat Phase-I Studie verlief vielversprechend, weshalb weiterführende Studien zur Zeit geplant sind (95). Avagacetat ist im Vergleich zu Begacestat noch selektiver für APP gegenüber Notch (193-fach) und hat auch einen stärkeren Effekt im Bezug auf die Fähigkeit die A β -Peptid Bildung zu senken (94). Die klinische Entwicklung von Avagacetat wird jedoch auf Grund mangelnder Wirksamkeit in einer Phase-II Studie zur Zeit nicht weiterverfolgt (96).

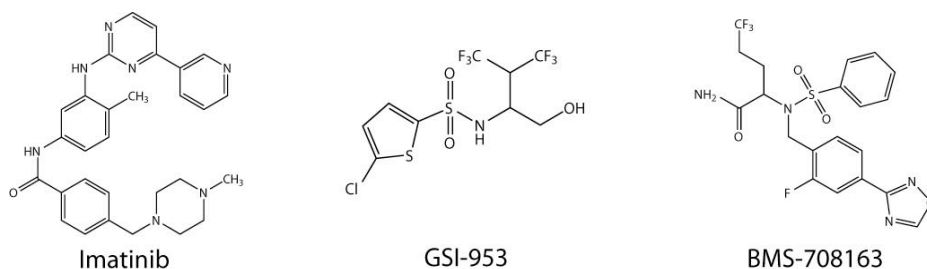


Abb. 8: Auswahl selektiver γ -Sekretase-Inhibitoren

In klinischen Studien zeigten γ -Sekretase-Inhibitoren bisher keinen signifikanten Nutzen. Teilweise mussten diese Studien auf Grund massiver Nebenwirkungen vorzeitig gestoppt werden. Eine weitere Möglichkeit die Menge an toxischen A β 42-Peptiden zu senken ist die Modulation der γ -Sekretase durch γ -Sekretase-Modulatoren (GSM). Diese Wirkstoffe verändern nicht die A β -Peptid-Konzentration im Gehirn, sondern verschieben die Produktion von längeren, toxischen A β -Peptiden (A β 42) zu kürzeren, besser löslichen Formen (A β 37-39) (97). Bei der Verwendung von GSM treten die für die GSI beschriebenen Nebenwirkungen nicht auf. GSM besitzen zwar ebenfalls einen Effekt auf die Prozessierung von Notch, allerdings wird die Freisetzung der intrazellulären Domäne von Notch und damit der weiterführende Signalweg nicht gehemmt. In präklinischen Untersuchungen zeigten einige nicht-steroidale Antiphlogistika (NSAID), unabhängig von ihrer Wirkung auf Cyclooxygenasen (COX), eine Wirkung im Sinne einer γ -Sekretase-Modulation (98). Der genaue Wirkmechanismus dieser Substanzen ist noch weitgehend unklar. Erste Hinweise sprechen jedoch für eine allosterische Hemmung der γ -Sekretase (99). In einer prospektiven Kohortenstudie der Erasmus Universität Rotterdam konnte nachgewiesen werden, dass die Langzeiteinnahme von NSAIDs das Erkrankungsrisiko von Morbus Alzheimer um bis zu 80 Prozent verringert (100). In Folge dieser vielversprechenden Daten wurden weitere Studien, wie der Alzheimer's Disease Anti-inflammatory Prevention Trial (ADAPT) durchgeführt, in dem mehr als 2500 Teilnehmern täglich Celecoxib, Naproxen oder Placebo verabreicht wurde. Diese Studie musste jedoch wegen kardiovaskulärer Komplikationen vorzeitig abgebrochen werden. Eine eindeutige klinische Wirksamkeit von NSAIDs konnte nicht nachgewiesen werden (101). In einer Fall-Kontroll-Studie zeigte die langfristige Einnahme des nicht-steroidalen Antiphlogistikums Ibuprofen jedoch wiederum ein signifikant vermindertes Risiko für das Auftreten von Morbus Alzheimer (102). Um Klarheit in diese heterogenen Ergebnisse zu bringen, wurde eine Metastudienanalyse von 14 klinischen Studien durchgeführt. Diese hat nun ergeben, dass weder NSAIDs noch selektive COX-2 Inhibitoren einen signifikanten Einfluss auf die alters- und amyloidabhängigen Defizite bei der Lern- und Gedächtnisleistung besitzen, weshalb die Behandlung von Morbus Alzheimer mit diesen Medikamenten nicht empfohlen wird (103).

1.2.2.2 β -Sekretase Inhibitoren

An der Produktion von A β -Peptiden ist neben der γ -Sekretase auch die β -Sekretase beteiligt. Eine Inhibierung dieser Sekretase sollte also die Menge der gebildeten A β -Peptide vermindern und stellt somit ein weiteres Zielmolekül der Arzneistoffforschung bei Morbus Alzheimer dar. Hong et al. konnten die Röntgenkristallstruktur von BACE1 (β -site APP cleaving enzyme 1) im Komplex mit einem peptidischen Inhibitor identifizieren (104). Dieser Inhibitor eignet sich dennoch nicht für die Therapie des Morbus Alzheimer, da man mit großen Proteinmolekülen therapeutisch nur schwer umgehen kann. In Verbindung mit der Kristallstruktur bietet er aber ein gutes Werkzeug für die Suche nach kleinen, wirkstoffartigen Molekülen.

Aus diesen rationalen Ansätzen und einer Lead-Optimierung wurde von der Firma Eli Lilly der BACE-Inhibitor LY2811376 (vgl. Abb. 9, Seite 30) entwickelt. Dieser oral verfügbare Wirkstoff weist ein niedriges Molekulargewicht (320 g/mol) auf, was das Überwinden der Blut-Hirn-Schranke begünstigt. Neben seiner hohen Selektivität für BACE1 konnte eine Absenkung der A β -Peptid Spiegel *in vitro* und *in vivo* gezeigt werden. Allerdings machte das Auftreten toxischer Nebenwirkungen in präklinischen Langzeitstudien die Beendigung klinischer Untersuchungen notwendig (105).



Abb. 9: Der BACE-Inhibitor LY2811376

Ein weiterer BACE-Inhibitor CTS-21166 (CoMentis, Struktur bis jetzt noch nicht veröffentlicht) befindet sich momentan in Entwicklung. Der Wirkstoff zeigte in Phase-I klinischer Studien eine gute Verträglichkeit und eine Reduktion der A β -Peptid Spiegel im Plasma von bis zu 80% (106). 2012 wurden klinische Studien für mehrere neue BACE1-Inhibitoren gestartet (Eli Lilly: LY2811376; Eisai: E2609; Merck: MK-8931; AstraZeneca: AZD3839). Bis zum jetzigen Zeitpunkt gibt es jedoch keine genaueren öffentlich zugänglichen Informationen über diese Wirkstoffe oder den Stand der klinischen Studien.

1.2.2.3 A β -Aggregationsinhibitoren

Neben der Hemmung der Produktion von A β -Peptiden ist ein weiterer therapeutischer Ansatz die Unterbindung ihrer Aggregation. Tramiprosat (vgl. Abb. 10, Seite 31) ist ein *small molecule*, das die Aggregation und Fibrillen-Bildung von A β -Peptiden bereits bei niedrigen mikromolekularen Konzentrationen in Tg2576-Mäusen verhindert (107). In Phase-I und -II Studien konnte nachgewiesen werden, dass Tramiprosat gut verträglich ist und die Spiegel von A β 42-Peptiden in der Zerebrospinalflüssigkeit (CSF) dosisabhängig senkt (108). In anschließenden Phase-III Studien konnten diese Ergebnisse jedoch nicht validiert werden. Das Unternehmen stoppte daraufhin die weitere klinische Untersuchung und entwickelt nun ein Prodrug von Tramiprosat (BLU8499), welches zu höheren Spiegeln des Wirkstoffs im Gehirn führen soll (109).

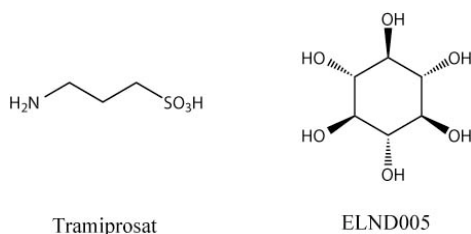


Abb. 10: Die A β -Aggregationsinhibitoren Tramiprosat und ELND005

Ein weiterer Hemmstoff der Aggregation von A β -Peptiden, die Substanz ELND005 (vgl. Abb. 10, Seite 31), ist ein Stereoisomer von Inositol. Dieser Wirkstoff ist in der Lage die Spiegel von A β -Peptiden in transgenen AD-Mausmodellen zu senken sowie Verhaltensauffälligkeiten zu verbessern (110). In klinischen Studien konnte für ELND005 eine gute Verträglichkeit, jedoch kein signifikanter Effekt auf die Hemmung der Aggregation von A β -Peptiden nachgewiesen werden. Elan Pharmaceuticals führt auf Grund der biologischen Wirksamkeit dennoch die klinische Untersuchung von ELND005 fort (111).

1.2.2.4 Immuntherapie

Ein weiterer Ansatz in der Wirkstoffforschung zur Therapie des Morbus Alzheimer ist die aktive oder passive Immunisierung. Als Wirkmechanismen werden im Wesentlichen zwei Möglichkeiten diskutiert (112). Die eine setzt voraus, dass die Antikörper das Gehirn erreichen, dort A β -Peptide opsonisieren und damit eine Fc-Rezeptor vermittelte

Phagozytose der Plaques durch Mikroglia induzieren. Bei der zweiten Theorie wird davon ausgegangen, dass der Antigen-Antikörper-Komplex in der Peripherie gebildet wird. Damit wird das Gleichgewicht der A β -Peptide zwischen Blut und Gehirn verändert, so dass A β -Peptide aus dem Gehirn in die Peripherie transportiert werden. Als Folge dessen stehen im Gehirn nicht mehr genügend A β -Peptide für die Bildung neuer Plaques zur Verfügung.

Aktive Immunisierung

Die Immunisierung mit A β 42-Peptiden generiert eine Antikörperantwort, welche signifikant die Dichte von A β -Plaques, neuritischen Dystrophien und die damit assoziierten entzündlichen Veränderungen vermindert (113). Ein Nachteil der aktiven Immunisierung ist, dass eine einmal hervorgerufene Immunantwort nicht mehr reversibel und daher schlecht zu steuern ist.

In der klinischen Untersuchung von AN1792 (A β 42-Peptide und Adjuvans QS-21) konnte eine starke Reduzierung der A β -Plaques nachgewiesen werden. Das Fortschreiten des Nervenuntergangs konnte jedoch nicht aufgehalten werden (114). Bei 6 Prozent der Studienteilnehmer entwickelte sich, vermutlich auf Grund von A β -spezifischen T-Lymphozyten, eine Meningoenzephalitis, weshalb die weitere klinische Untersuchung gestoppt wurde. Anscheinend besitzt das A β 42-Peptid innerhalb der zentralen Domäne und an dem C-terminalen Ende Epitope, die humane T-Zellen aktivieren können (115). Die aktive Immunisierung wurde aus diesen Gründen nicht weiter verfolgt.

Passive Immunisierung

Die passive Immunisierung besitzt im Gegensatz zur aktiven Immunisierung den Vorteil, dass keine Immunantwort des Patienten notwendig ist. Der Aufbau der Antikörper ist damit steuerbar und eine unspezifische Wechselwirkung mit anderen körpereigenen Proteinen unwahrscheinlich. So wurden Mäusen spezifische Anti-A β -Antikörper peripher verabreicht und ähnlich positive Effekte auf die A β -Plaquebildung wie bei der aktiven Immunisierung beobachtet. Dabei zeigte sich, dass die Fähigkeit A β -Plaques im Gehirn zu verringern vor allem mit der Bindungsfähigkeit des Antikörpers an aggregierte A β -Peptide zusammenhängt (116).

Bapineuzumab (Pfizer) ist ein monoklonaler, humanisierter Anti-A β -Antikörper, der von dem murinen Antikörper 3D6 abgeleitet wurde. Der Antikörper 3D6 ist in der Lage sowohl die Anzahl an A β -Plaques als auch die Menge an A β -Peptiden signifikant zu vermindern. Zusätzlich reduziert er die Entzündung und den Verlust von Synapsen in Gehirnen von APP-transgenen Mäusen (116). Trotz der vielversprechenden Ergebnisse von 3D6 in Tierversuchen, konnten für Bapineuzumab keine signifikanten Unterschiede der primären Endpunkte in klinischen Studien nachgewiesen werden. Als bei 9,7% der Studienteilnehmer vasogene Hirnödeme auftraten, wurde die weitere klinische Untersuchung gestoppt (117).

Solanezumab (Eli Lilly) ist ebenfalls ein monoklonaler Anti-A β -Antikörper (118). Die Hauptergebnisse zweier Phase-III Studien erzielten zwar nicht den kombinierten primären Endpunkt von Kognition und Funktion, jedoch ergab eine Subgruppenanalyse, dass Patienten mit leichten Formen der Erkrankung von der Verabreichung profitierten. Obwohl die Effekte dieses therapeutischen Ansatzes nur gering sind, zeigen diese Ergebnisse dennoch, dass die Verminderung von A β -Peptid Spiegeln in der Tat mit einer klinischen Verbesserung verbunden ist.

1.2.3 Zusammenfassung

Die Acetylcholinesterasehemmer Donepezil, Rivastigmin und Galantamin sind in der Anwendung fast ausschließlich auf frühe Stadien der Erkrankung beschränkt und können daher nur zeitlich begrenzt verwendet werden. In späten Stadien der Erkrankung wird hauptsächlich der NMDA-Rezeptor-Antagonist Memantin, teils in der Add-on-Therapie mit Donepezil, eingesetzt. Gemein haben diese Arzneimittel, dass sie nicht in der Lage sind das Fortschreiten der Krankheit zu verhindern (72).

Die meisten der in den letzten Jahren untersuchten Wirkstoffe zielten darauf ab, die Spiegel von toxischen A β -Peptiden zu senken. Jedoch konnte bis heute mit nahezu keinem dieser verschiedenen Ansätze ein überzeugender klinischer Nutzen nachgewiesen werden. Die Untersuchung von γ -Sekretase-Inhibitoren musste auf Grund von Wechselwirkungen mit dem Notch-Signalweg gestoppt werden. Für die daraufhin entwickelten γ -Sekretase-Modulatoren konnte bisher keine klinische Wirksamkeit nachgewiesen werden. Weder die Hemmung der β -Sekretase, noch die Therapie mit Aggregationsinhibitoren führte bislang zu überzeugenden Effekten in der Klinik (73). Für die passive

Immunisierung mit dem A β -Antikörper Solanezumab konnte nur ein Nutzen für Patienten mit leichten Formen des Morbus Alzheimer gezeigt werden.

Neueste Erkenntnisse zeigen, dass das Scheitern dieser vielfältigen Ansätze eventuell damit im Zusammenhang steht, dass mit der Therapie zu einem Zeitpunkt begonnen worden ist, bei dem die Schädigungen im Gehirn bereits irreversibel sind und ein weiteres Fortschreiten der Erkrankung nicht mehr aufzuhalten ist (119). Deshalb sind neue innovative Ansätze gefragt, die bereits zu einem frühen Zeitpunkt im Krankheitsverlauf angreifen und so das weitere Fortschreiten tatsächlich verhindern können. In der hier vorliegenden Arbeit wurde versucht, durch die gleichzeitige Adressierung unterschiedlicher für die Pathogenese des Morbus Alzheimer wichtiger pathophysiologischer Mechanismen einen solchen neuen Therapieansatz zu erarbeiten.

2 Material und Methoden

2.1 Untersuchung der Freisetzung von Kalzium aus dem ER

Wie bereits in Kapitel 1.1.4 erläutert wird in der Pathogenese des Morbus Alzheimer eine Störung der intrazellulären Kalziumhomöostase diskutiert. Um die Wirkung von verschiedenen Molekülen auf die Normalisierung der erhöhten Freisetzung von Kalzium aus dem endoplasmatischen Retikulum (ER) zu untersuchen, wurde ein im Arbeitskreis von Prof. Herms von Honarnejad et al. entwickeltes Screening-Verfahren verwendet (120). HEK293 Zellen, die eine krankheitsverursachende Mutation von Präsenilin 1 (M146L) überexprimieren, zeigen bei Applikation des muskarinergen Parasympathomimetikums Carbachol eine gegenüber Kontrollzellen erhöhte, IP₃-induzierte Freisetzung von Kalzium aus dem ER. Zur Messung der freien intrazellulären Kalziumkonzentration wurden Zellen verwendet, die zusätzlich zu der PS1-Mutation auch den genetischen, FRET (Förster-Resonanzenergietransfer) basierten Kalziumindikator *Yellow Cameleon 3.6* (121) exprimieren (vgl. Abb. 11, Seite 35).

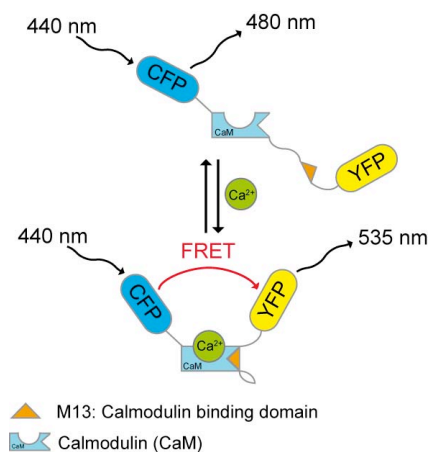


Abb. 11: Yellow Cameleon 3.6

Yellow Cameleon 3.6 (YC 3.6) ist ein FRET basiertes Kalziumindikatorprotein. Bei Anregung mit 440 nm kann in Abwesenheit von Kalzium emittiertes Licht bei 480 nm gemessen werden. Sobald Kalzium an Calmodulin bindet, vollzieht YC 3.6 eine strukturelle Veränderung, wodurch der Förster-Resonanzenergietransfer (FRET) möglich ist und CFP (Cyan fluoreszierendes Protein) YFP (Gelb (*yellow*) fluoreszierendes Protein) anregt. In Folge dessen kann nun die Emission von YFP bei 535nm gemessen werden.

Mit diesem Kalziumindikator ist es möglich, sowohl die basale Kalziumkonzentration, als auch die durch Agonisten hervorgerufene Freisetzung von Kalzium aus dem ER zu messen. Dafür wurden Zellen in einer Konzentration von 13000 Zellen pro *well* in einem Volumen von 40 μl auf 384-*well* Platten (CellCarrier; PerkinElmer) gesät. Die mit Kollagen beschichteten Platten gewährleisteten ein optimales Wachstum der Zellen. Als Wachstumsmedium diente *Dulbecco's Modified Eagle Medium* (DMEM), das mit 10% fötalem Kälberserum (FBS), 100 IU/mL Penicillin, 100 $\mu\text{g/mL}$ Streptomycin, 1 mM GlutaMAX und Selektionsantibiotika versetzt war. Nach einer Inkubationszeit von 6 Stunden unter Standardbedingungen (37°C, 5% CO₂) wurden die zu untersuchenden Wirkstoffe, die Positivkontrollen (Thapsigargin (1 μM), CPA (20 μM), TMB-8 (50 μM)) und das Vehikel (DMSO) mit Hilfe eines Pipetierroboters zugegeben. Jeder Wirkstoff wurde in 6 verschiedenen Konzentrationen (30 μM , 10 μM , 3 μM , 1 μM , 300 nM und 100 nM) in 1% DMSO in 4 Parallelversuchen nach einer Inkubation von 24 Stunden vermessen. Das anschließende Anfärben des Zellkerns durch DRAQ5 (500 nM) dient der späteren automatischen Zellerkennung. Weitere 2 Stunden später wurden die Platten mit Hilfe des automatisierten, konfokalen Aufnahmesystems Opera (Perkin Elmer) vermessen (vgl. Abb. 12, Seite 37). Ein Laser mit einer Wellenlänge von 440 nm wurde zur Anregung von *Yellow Cameleon 3.6* eingesetzt, ein weiterer 640 nm Laser zur Anregung von DRAQ5. Entsprechende Filter trennten die Signale von CFP, YFP und DRAQ5. Nach der Aufzeichnung (1 Bild pro Sekunde) der basalen Kalziumkonzentration über 5 Sekunden erfolgte die Applikation von Carbachol in einer Endkonzentration von 10 μM ohne Unterbrechung der Aufnahmesequenz. Die Aufzeichnung des Kalziumsignals erfolgte für weitere 30 Sekunden, bevor anschließend das nächste *well* vermessen wurde.

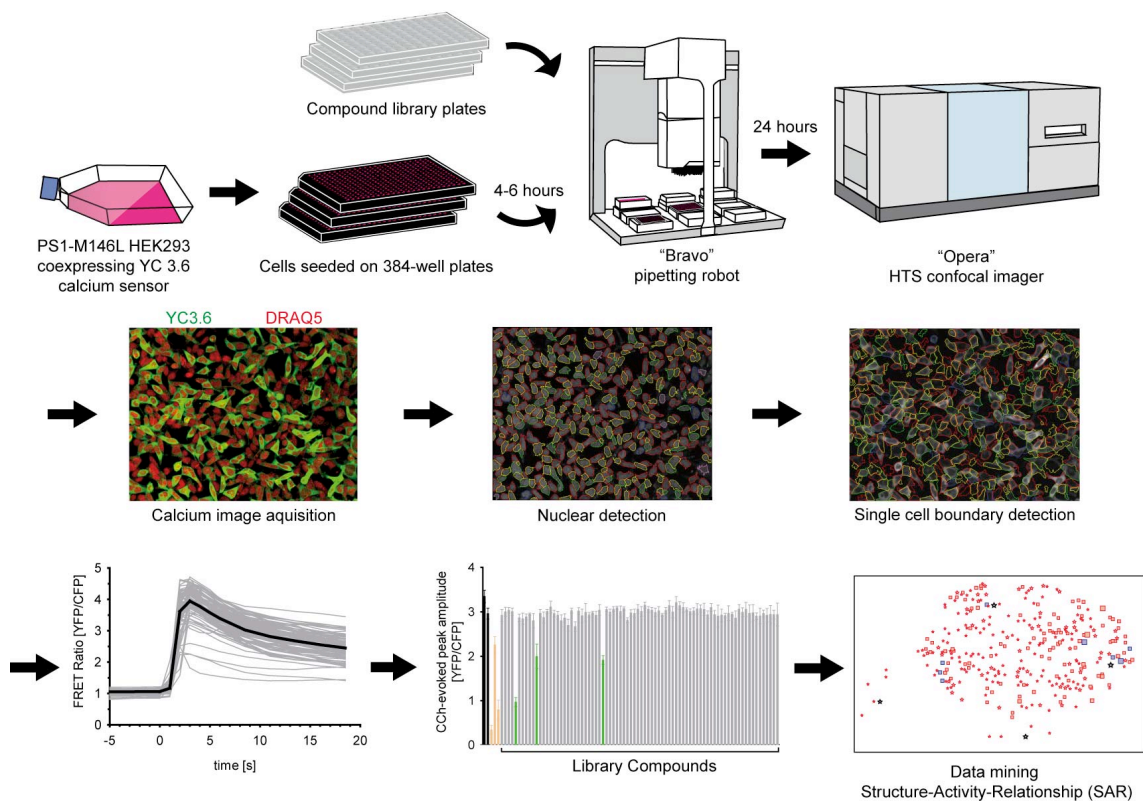


Abb. 12: Schematischer Überblick über die Messung der Freisetzung von Kalzium aus dem endoplasmatischen Retikulum im Hochdurchsatz und die Datenanalyse

Ein von Honarnejad et al. mit der Software Acapella (Perkin Elmer) entwickeltes Analysetool (*122*) wandelt die Fluoreszenzbilder in numerische Werte um und detektiert anhand des Signals von YC3.6 und DRAQ5 jede einzelne Zelle. So kann durch die Berechnung des Verhältnisses von YFP/CFP die Konzentration von Kalzium im Zytosol einzelner Zellen über den gesamten Verlauf des Experiments verfolgt werden. Die Berechnung des Mittelwertes der Spitzenamplituden aller Zellen eines *well*s dient als finaler Output.

Material

Acapella	Perkin Elmer
Bravo Pipettierroboter	Agilent Technologies
Carbachol	Calbiochem; 212385
CellCarrier	Perkin Elmer
Cyclopiazonic acid (CPA)	Calbiochem; 239805
DMEM 4,5g/L Glukose	PAN Biotech; O04-03600
DMSO	Sigma; D4540
DRAQ5	Biostatus; DR 51000
Fötales Kälber Serum SeraPlus	PAN Biotech; 3702-P111606
Geneticin (G418)	Gibco; 11811-031
GlutaMAX	Gibco; 35050-038
Hämozytometer	Labor Optik; Neubauer Improved
HBSS	PAN Biotech; P04-32500
Hygromycin B	Invitrogen; 10687-010
Mikroskop Axiovert 40 CFL	Zeiss
Opera	PerkinElmer
PBS	PAN Biotech; P04-36500
PenStrep	Gibco; 15140-122
Thapsigargin	Calbiochem; 586005
TMB-8	Sigma; T111
Trypsin-EDTA 0,05%	Gibco; 25300-054
Zeocin	Invitrogen; R25001
Zentrifuge	Eppendorf; 5804 R

2.2 Die Substanzbibliothek DIVERSet™

Für die systematische Suche nach neuen Wirkstoffen wurde auf die Substanzbibliothek DIVERSet™ der Firma ChemBridge zurückgegriffen. Getestet wurden 2 Teilbibliotheken mit jeweils 10000 Substanzen, die von der Firma ChemBridge so ausgewählt worden waren, dass sie vielversprechende pharmakologische Eigenschaften besitzen. Diese Auswahl basiert auf 3D-Pharmakophor-Analysen (123), bei denen Eigenschaften von bekannten Medikamenten einbezogen worden sind. Die DIVERSet™ Bibliotheken decken laut ChemBridge ein großes Gebiet aller möglichen Pharmakophore ab, so dass möglichst viele, strukturell unterschiedliche Substanzen enthalten sind. Die meisten Substanzen erfüllen die Kriterien der „Lipinski’s rule of five“. Diese Faustregel besagt, dass Substanzen eine gute orale Bioverfügbarkeit haben, die nicht mehr als 5 Wasserstoffbrücken-Donatoren (z.B. OH- oder NH-Gruppen), nicht mehr als 10 Wasserstoffbrücken-Akzeptoren (z.B. O oder N), eine Molekülmasse von unter 500 g/mol und eine Lipophilie logP von maximal 5 besitzen (124).

Zusätzlich zu den Molekülen wurden die chemischen Informationen der einzelnen Substanzen in Form von Dateien im sdf-Format (*structure data file*) von ChemBridge zur Verfügung gestellt. Hierbei ist jedem Molekül eine 7-stellige Nummer zugeordnet.

2.3 Synthese von Tetrahydrocarbazolen und der MTT Test

Die Synthese weiterer Tetrahydrocarbazole wurde von André Gehring am Department für Pharmazie an der Ludwig-Maximilians-Universität München durchgeführt (120). Für die eindeutige Zuordnung jedes einzelnen Moleküls tragen diese das Kürzel von André Gehring (gea) und eine 2- oder 3-stellige Ziffer.

Bei den kommerziell erhältlichen und den eigens synthetisierten Tetrahydrocarbazolen wurde von Martina Stadler aus dem Arbeitskreis von Herrn Prof. Dr. Franz Bracher standardmäßig ein MTT Test für die Bestimmung möglicher zytotoxischer Eigenschaften durchgeführt (125).

2.4 Strukturelle Clusteranalyse

Für die Identifizierung neuer Leitstrukturen und die Anordnung strukturell ähnlicher Substanzen in Cluster, wurde eine Lizenz für das kommerzielle Softwarepaket Benchmark HTS DataMiner der Firma Tripos erworben. Diese Software bestimmt die Ähnlichkeiten verschiedener Substanzen nicht direkt anhand ihrer Molekülstrukturen, sondern mit Hilfe abstrakterer Beschreibungen, sogenannter Fingerabdrücke. DataMiner verwendet hier das nicht offen dargelegte Fingerabdrucksystem UNITY. Ein chemischer Fingerabdruck wird aus einem Molekül generiert, indem spezifische Muster für jedes einzelne Atom, seine Nachbarn und die Bindungsarten, über die sie verbunden sind, dargestellt werden. Zusätzlich wird der Pfad und die Atome über bis zu 7 Bindungen analysiert. Als Ausgabe dient dann ein Set an Bits, welches die strukturellen Komponenten des Moleküls beschreibt. Über den Algorithmus „OptiSim“ generiert DataMiner anhand struktureller Ähnlichkeiten der Moleküle Cluster und stellt diese in Form einer SAR(*structure activity relationship*)-Karte dar (vgl. Abb. 13, Seite 40).

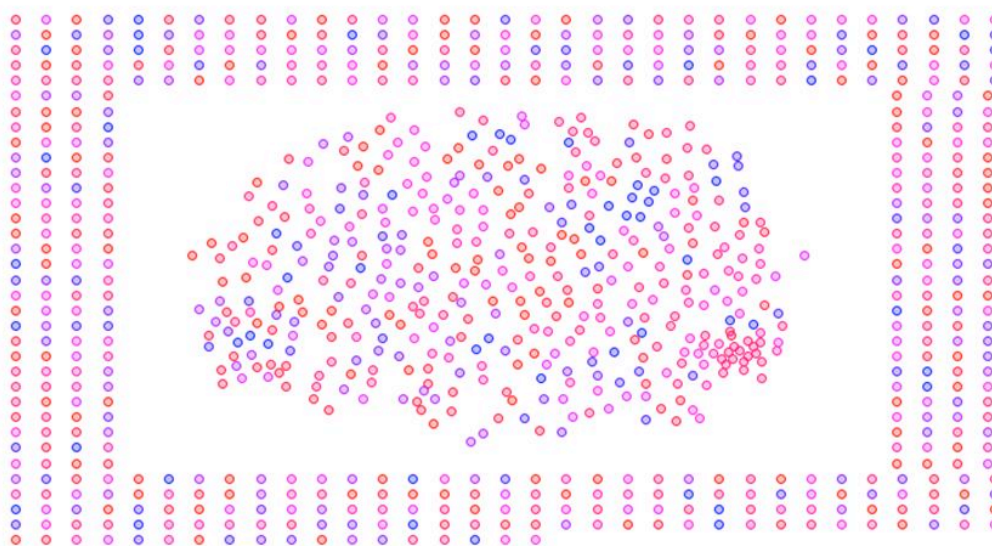


Abb. 13: Darstellung einer mit der Software DataMiner erstellten SAR-Karte

Zu sehen sind Cluster, denen strukturell ähnliche Moleküle zugeordnet sind. Je näher sich zwei Cluster sind, desto ähnlicher sind die in ihnen enthaltenen Moleküle. Cluster, die am Rand angeordnet sind konnten nicht in Beziehung zu anderen Clustern eingeordnet werden. Größe, Farbe und Form der einzelnen Cluster sind in dieser Abbildung noch nicht weiter spezifiziert.

Bei der Erstellung der SAR-Karte wurden zunächst nur jene Moleküle verwendet, die in der Lage waren die Kalziumkonzentration im Zytosol (vgl. Kapitel 1.1.4, Seite 19) auf unter 90% des Vergleichswertes (DMSO) abzusenken. Somit wird jeder Hit einem Cluster zugeordnet und anschließend alle inaktiven Moleküle in die bestehenden Cluster sortiert. Der Abstand zwischen den verschiedenen Clustern ist ein Maß für die Unterschiedlichkeit der Substanzen, die den jeweiligen Clustern angehören. Als nächstes wurde die Größe der dargestellten Symbole mit der Anzahl an allen Molekülen in den einzelnen Clustern korreliert. Farbe und Form repräsentieren die Anzahl und Häufigkeit von aktiven Molekülen in einem Cluster (siehe Abb. 19, Seite 65).

2.5 Untersuchung des mitochondrialen Membranpotentials

In Kapitel 1.1.4 wurden die Evidenzen einer Störung der mitochondrialen Aktivität in der Pathogenese des Morbus Alzheimer beschrieben. Um die mitochondriale Aktivität zu bestimmen wird typischerweise das mitochondriale Membranpotential (ψ_m) gemessen. In Mitochondrien werden Protonen über die Innenmembran aus der Matrix in den Membranzwischenraum transportiert und bilden so das mitochondriale Membranpotential. Der hier entstandene Protonengradient treibt die ATP-Synthase an (126). Die Messung des mitochondrialen Membranpotentials ist daher eine Methode zur Erfassung der mitochondrialen Integrität und korreliert mit der zellulären Energiesyntheseleistung. Für die Messung des Membranpotentials werden positiv geladene Fluoreszenzfarbstoffe verwendet, die auf Grund ihrer Ladung in den negativ geladenen Mitochondrien akkumulieren. Hier wurde der positiv geladene Rhodamin-Fluoreszenzfarbstoff Tetramethylrhodaminmethylester (TMRM, vgl. Abb. 14, Seite 41) verwendet (127, 128).

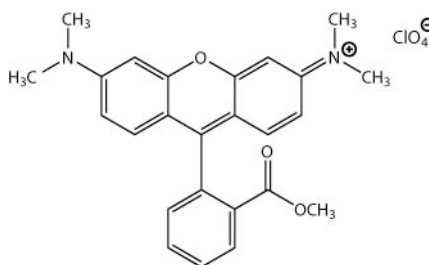


Abb. 14: Tetramethylrhodaminmethylester (TMRM)

Die Messmethode wurde von Scaduto et al. adaptiert (129). So wurden HEK293 Zellen mit einer Dichte von 50000 Zellen pro *well* auf Kollagen/Poly-L-Lysin beschichtete 96-*well*-Platten (Advanced-TC plates, Greiner Bio-One) gesät. Als Wachstumsmedium diente *Dulbecco's Modified Eagle Medium* (DMEM), das mit 10% fötalem Kälberserum (FBS), 100 IU/mL Penicillin, 100 µg/mL Streptomycin und 1 mM GlutaMAX versetzt war. Nach Inkubation über 24 Stunden bei Standardbedingungen (37 °C, 5% CO₂) wurden die Zellen für 1 Stunde mit Vehikel (DMSO) oder den zu untersuchenden Molekülen in 6 verschiedenen Konzentrationen (30 µM, 10 µM, 3 µM, 1 µM, 300 nM und 100 nM) in 1% DMSO behandelt und anschließend mit 50 nM TMRM versetzt. Die Zellen wurden nach 30 Minuten dreimal mit PBS gewaschen und anschließend Medium, das Vehikel oder die zu untersuchenden Substanzen enthält, zugegeben. Als nächstes wurden die lebenden Zellen mit dem inversen, konfokalen Mikroskop LSM510 (Zeiss) bei einer Vergrößerung von 20x vermessen und die relativen Fluoreszenzeinheiten (RFU) von TMRM aufgezeichnet. Die entstandenen Bilder wurden mit der Software ImageJ ausgewertet und der Effekt der einzelnen Moleküle in 8 verschiedenen *wells* analysiert.

Material

Advanced-TC plates 96 well, µclear, black	Greiner Bio-One; G55986
AIM 4.2	Zeiss
DMEM 4,5g/L Glukose	PAN Biotech; P04-03600
DMSO	Sigma; D4540
Fötales Kälber Serum SeraPlus	PAN Biotech; 3702-P111606
Epifluoreszenz-Lampe HBO-100	Zeiss
GlutaMAX	Gibco; 11811-031
Hämozytometer	Labor Optik; Neubauer Improved
HBSS	PAN Biotech; P04-32500
ImageJ	NIH, USA; Version 1.45s
Kollagen	Sigma; C7661

LD Plan Neofluar 20x/0.4	Zeiss; 441340-9970
Mikroskop LSM510 invers	Zeiss
Mikroskop Axiovert 40 CFL	Zeiss
PBS	PAN Biotech; P04-36500
PenStrep	Gibco; 15140-122
Poly-L-Lysin	Sigma; P8920
TMRM	Invitrogen; T668
Trypsin-EDTA 0,05%	Gibco; R25001
Zentrifuge	Eppendorf; 5804 R

2.6 Untersuchung der A β -Peptid Spiegel

Ein wichtiges Kennzeichen des Morbus Alzheimer sind die im Gehirn auftretenden Amyloid Plaques, die hauptsächlich aus aggregierten A β -Peptiden bestehen (vgl. Kapitel 1.1.1.1). Man geht davon aus, dass als Folge einer medikamentösen Verminderung der A β -Peptid-Spiegel keine neuen Plaques mehr entstehen. Daher wurde in der vorliegenden Arbeit die Wirkung der im oben beschriebenen Screen identifizierten Moleküle auf die Produktion von A β -Peptiden untersucht. Ein möglicher Effekt ist am besten zu sehen, wenn große Mengen an A β -Peptiden produziert werden, weshalb HEK293 Zellen verwendet wurden, die die Mutationen PS1-M146L und APPswe überexprimieren. Mit Hilfe der Sandwich-ELISA-Technik konnte die Konzentration von 3 unterschiedlich langen A β -Peptiden (A β 42, A β 40 und A β 38) bestimmt werden. Mit diesen 3 Werten ist man in der Lage, erste Abschätzungen zu dem Wirkmechanismus der getesteten Moleküle zu treffen. So verändern zum Beispiel γ -Sekretase-Modulatoren das Verhältnis von A β 42/A β 40.

Poly-D-Lysin beschichtete 24-*well*-Platten (BD Biocoat) wurden zusätzlich mit Kollagen behandelt, damit die Zellen besser auf der Platte anhaften. Entsprechend Page et al. (130) wurden 200000 Zellen pro *well* in 500 μ L Medium gesät. Als Wachstumsmedium diente *Dulbecco's Modified Eagle Medium* (DMEM), welches mit 10% fötalem Kälberserum (FBS), 100 IU/mL Penicillin, 100 μ g/mL Streptomycin, 1 mM GlutaMAX

und Selektionsantibiotika versetzt war. Nach Inkubation unter Standardbedingungen (37 °C, 5% CO₂) wurde das Medium abgesaugt. Anschließend wurde frisches Medium (500 µL), welches das Vehikel oder die zu untersuchenden Substanzen in 6 verschiedenen Konzentrationen (30 µM, 10 µM, 3 µM, 1 µM, 300 nM und 100 nM) in 1% DMSO enthält, zugegeben. Nach 16 Stunden wurde das nun konditionierte Medium abgenommen und bis zur Vermessung bei -80 °C asserviert. Die Peptidspiegel von Aβ₄₂, Aβ₄₀ und Aβ₃₈ wurden mit Hilfe des „Human (6E10) Abeta 3-Plex“ Sandwich-ELISA-Immunoassay System (Meso Scale Discovery (MSD)) nach Anweisung des Herstellers bestimmt. So wurden 150 µL des MSD Blocker-A in jedes *well* der ELISA Platte gegeben und für 1 Stunde bei Raumtemperatur unter Schütteln inkubiert. Im Anschluss wurden die Platten dreimal mit MSD Tris-Waschpuffer gewaschen und mit 25 µL Detektionsantikörper, sowie 25 µL der Proben oder Kalibratoren für weitere 2 Stunden unter Schütteln inkubiert. Es erfolgten drei weitere Waschschrte und die Zugabe von 150 µL MSD-Read-Buffer T. Im direkten Anschluss wurde die Lichtemission nach elektrochemischer Stimulation unter Verwendung des MSD Sector Imager 2400[®] aufgezeichnet und die entsprechenden Aβ-Peptid Konzentrationen mit Hilfe der Software MSD Workbench berechnet.

Material

Aβ ₁ -38 Peptid	MSD
Aβ ₁ -40 Peptid	MSD
Aβ ₁ -42 Peptid	MSD
Biocoat PDL 24 well Platten	BD; 354414
Blocker A	MSD
Blocker G (100X)	MSD
DMEM 4,5g/L Glukose	PAN Biotech; P04-03600
DMSO	Sigma; D4540
DMSO	MSD
Fötales Kälber Serum SeraPlus	PAN Biotech; 3702-P111606

Geneticin (G418)	Gibco; 11811-031
GlutaMAX	Gibco; 35050-038
Hämozytometer	Labor Optik; Neubauer Improved
Kollagen	Sigma; C7661
Mikroskop Axiovert 40 CFL	Zeiss
MULTI-SPOT Abeta-Peptid 3-plex Plate	MSD
MSD Sector Imager 2400 [®]	MSD
MSD Workbench	MSD
PBS	PAN Biotech; P04-36500
PenStrep	Gibco; 15140-122
Read Buffer T (4X)	MSD
Sector Imager 2400 [®]	MSD
Steriles, deionisiertes Wasser	VE-Wasser autoklaviert
SULFO-TAG [™] 6E10 Detection Antibody (50X)	MSD
Tris Wash Buffer (10x)	MSD
Trypsin-EDTA 0,05%	Gibco; 25300-054
Zentrifuge	Eppendorf; 5804 R
Zeocin	Invitrogen; R25001

2.7 Glutamatoxizität

Glutamat ist der am stärksten vertretene exzitatorische Neurotransmitter im Zentralen Nervensystem und wird bei der neuronalen Signalübertragung in großen Mengen am synaptischen Spalt freigesetzt. Die erhöhte Toxizität von Glutamat in neuronalen Primärzellkulturen von transgenen Mausmodellen des Morbus Alzheimer ist durch einen erhöhten Kalziumeinstrom bedingt (62).

Um die erhöhte Glutamatoxizität an neuronalen Primärzellkulturen in Alzheimertransgenen Tieren zu untersuchen, wurden Neuronen aus den Hippocampi embryonaler Mäuse auf dem Hintergrund der Wildtyp-Linie FVB in Anlehnung an die Methode von Banker und Goslin präpariert (131, 132). Der Vorteil einer embryonalen Kultur im Vergleich zu der Verwendung postnataler Hirne liegt vor allem in deren größeren Robustheit. Zur Untersuchung kamen hier FVB-Mäuse, die entweder humanes Wildtyp Präsenilin-1 (S182), oder eine FAD-Mutation im Präsenilin-1 Gen (A246E) exprimieren. Die schwangere Maus wurde 17 Tage nach Befruchtung mittels zervikaler Dislokation getötet, der Uterus entfernt und in eine sterile Petrischale überführt. Alle nun folgenden Schritte erfolgten – soweit möglich – unter sterilen Bedingungen. Die Feten wurden dekapitiert und, nach dem Entfernen der Meningen, die Hippocampi unter einem Dissektionsmikroskop in eisgekühlter HBSS (Hank's balanced salt solution) herauspräpariert. Alle Hippocampi eines Wurfes wurden nun in einem 15 mL Zentrifugenröhrchen in ebenfalls eiskalter HBSS gesammelt und 2x mit HBSS gewaschen. Dann wurde die Flüssigkeit durch 5 mL Trypsin (0,05%) ersetzt und für 20 Minuten im Wasserbad bei 37°C inkubiert. Die Enzymreaktion wurde mittels Austausch des Mediums durch *Dulbecco's Modified Eagle Medium* (DMEM), das mit 10% fötalem Kälberserum (FBS), 100 IU/mL Penicillin, 100 µg/mL Streptomycin und 1 mM GlutaMAX versetzt war, gestoppt. Die Zellen wurden insgesamt 3x mit Medium gewaschen. Anschließend wurden die Zellen dissoziiert und deren Anzahl mittels eines Hämocytoometers bestimmt. Idealerweise erhält man aus einem Gehirn etwa 500000 Zellen. Die Anzahl der Zellen wurde auf 250000 pro mL eingestellt und 500 µL (125000 Zellen) in jedes *well* einer mit PLL-beschichteten 24-*well* Platte pipettiert. Nach Inkubation von 6 Stunden bei Standardbedingungen (37 °C, 5% CO₂) wurde das Medium gegen Neurobasal A, das mit 1 mM GlutaMAX und B27 serum-free supplement versehen war, ausgetauscht. Nun wurde alle 3-4 Tage die Hälfte des Mediums abgenommen und durch frisches Medium ersetzt. Die Zellen gelten mit 10 Tagen in Kultur (*days in vitro*, DIV) als reif. Anschließend wurden die Zellen entweder mit DMSO oder gea_133 (Endkonzentration 10 µM) behandelt und für 24 Stunden inkubiert. Dann wurde Glutamat in verschiedenen Konzentrationen (0 µM, 10 µM und 50 µM Endkonzentration) zugegeben. Da das verwendete Medium kein Kalzium enthält, wurde dieses entweder mit 300 µM oder 3 mM Kalzium (angegeben sind jeweils die Endkonzentrationen) versetzt und für weitere 24 Stunden inkubiert. Die Lebensfähigkeit der Zellen wurde mit Hilfe des Cell Proliferation Kit I (Roche) gemessen. Dieser Test beruht auf der Reduktion des gelben Tetrazoli-

umsalzes 3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium-bromid (MTT) zum violetten Formazan durch NADH und NADPH der intakten Zellen (vgl. Abb. 15, Seite 47).

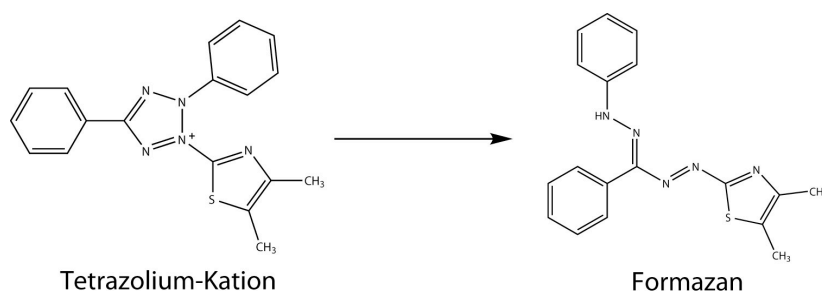


Abb. 15: Reduktion des Tetrazoliumsalzes (MTT) zum Formazan

Nach Anweisung des Herstellers wurden die Zellen für 4 h mit *MTT labeling reagent* behandelt und anschließend mit der *Solubilization solution* über Nacht inkubiert. Am nächsten Tag wurde das Medium in eine 96 *well* Platte überführt und mit dem ELISA Lesegerät FLUOStar Optima bei 560 nm vermessen. Die gemessenen Daten wurden mit Hilfe der Software Optima ausgewertet.

Material

B-27	Gibco; 17504-044
Biocoat PDL 24 well Platten	BD; 354414
Cell Proliferation Kit I (MTT)	Roche; 11 465 007 001
MTT labeling reagent	
Solubilization solution	
DMEM 4,5g/L Glukose	PAN Biotech; P04-03600
DMSO	Sigma; D4540
Dissektionsmikroskop Stemi 2000-C	Zeiss
FLUOStar Optima	BMG Labtech; Firmware 1.26

Software Optima	BMG Labtech; Version 1.26
Fötales Kälber Serum SeraPlus	PAN Biotech; 3702-P111606
GlutaMAX	Gibco; 35050-038
Hämozytometer	Labor Optik; Neubauer Improved
Kalziumchlorid	Sigma; C2661
Mikroskop Axiovert 40 CFL	Zeiss
Natriumglutamat	Sigma; 49621
Neurobasal A	Gibco; 10888-022
NUNC 96 well Platte	Nunc; 167008
PBS	PAN; P04-36500
PenStrep	Gibco; 15140-122
Petrischale	Hartenstein; PP60
Pinzetten	FST 11009-13; 11251-20;
Poly-L-Lysin	Sigma; P8920
Scheren	FST; 91460-11; 91400-12
Trypsin-EDTA 0,05%	Gibco; 25300-054
Zentrifuge	Eppendorf; 5804 R

2.8 In vivo Versuche

Die im Folgenden beschriebenen Tierversuche wurden durch den Antrag zum Tierversuchsvorhaben mit dem Titel „Korrelative Untersuchung der A β - und tau-assoziierten Pathologie im Auge und in der Hirnrinde von transgenen Mausmodellen des Morbus Alzheimer“ Az. 55.2-1-54-2531-188-09 geprüft und genehmigt, und entsprechend der Richtlinien des Zentrums für Neuropathologie und Prionforschung und der Regierung von Oberbayern durchgeführt.

2.8.1 Toxikologie

Bevor ein bisher unbekannter Wirkstoff im Rahmen eines Therapieversuches Tieren verabreicht werden kann, müssen mögliche akute toxische Eigenschaften des Wirkstoffes identifiziert werden. Die akute Toxizität von gea_133 und gea_97 wurde anhand der Richtlinien der OECD (Organisation for Economic Cooperation and Development) für die Testung von Chemikalien, Sektion 4 untersucht. Die Bestimmung der akuten Toxizität wurde anhand des OECD Test 423 (Acute Oral Toxicity – Acute Toxic Class Method) durchgeführt (133). Diese Methode beschreibt ein schrittweises Vorgehen bei dem 3 gleichgeschlechtliche Tiere pro Schritt verwendet werden; sie ist aktuell dafür anerkannt, bei einer möglichst geringen Anzahl von Versuchstieren den LD₅₀-Wert einer Substanz vorauszusagen. Die Substanzen wurden an insgesamt 9 weiblichen C57/Bl6 Mäusen im Alter von 10 Wochen getestet. Da weibliche Tiere auf toxische Substanzen empfindlicher reagieren, werden für diese Untersuchung standardmäßig weibliche Tiere verwendet. Bei bisher unbekannten Stoffen, wie den hier untersuchten Molekülen, wird eine Startdosis von 300 mg/kg Körpergewicht empfohlen. Zunächst wurde gea_133 beziehungsweise gea_97 in DMSO gelöst. Anschließend wurde diese Stammlösung in verschiedenen Anteilen mit Pflanzenöl vermengt, so dass die in dem Schema angegebenen Endkonzentrationen erreicht wurden. Vor Verabreichung der Lösung wurde durch 3-stündiges Fasten der Versuchstiere sichergestellt, dass deren Magen entleert ist. Dieses Vorgehen reduziert das Verletzungsrisiko und die Gefahr des Aspirierens der Lösung während der Applikation. Anschließend wurde die Lösung der Wirkstoffe jeweils drei Tieren mittels einer Magensonde in einer einzigen Dosis (150 μ L) verabreicht. Das weitere Schema ist in Abb. 16 auf Seite 50 zu sehen.

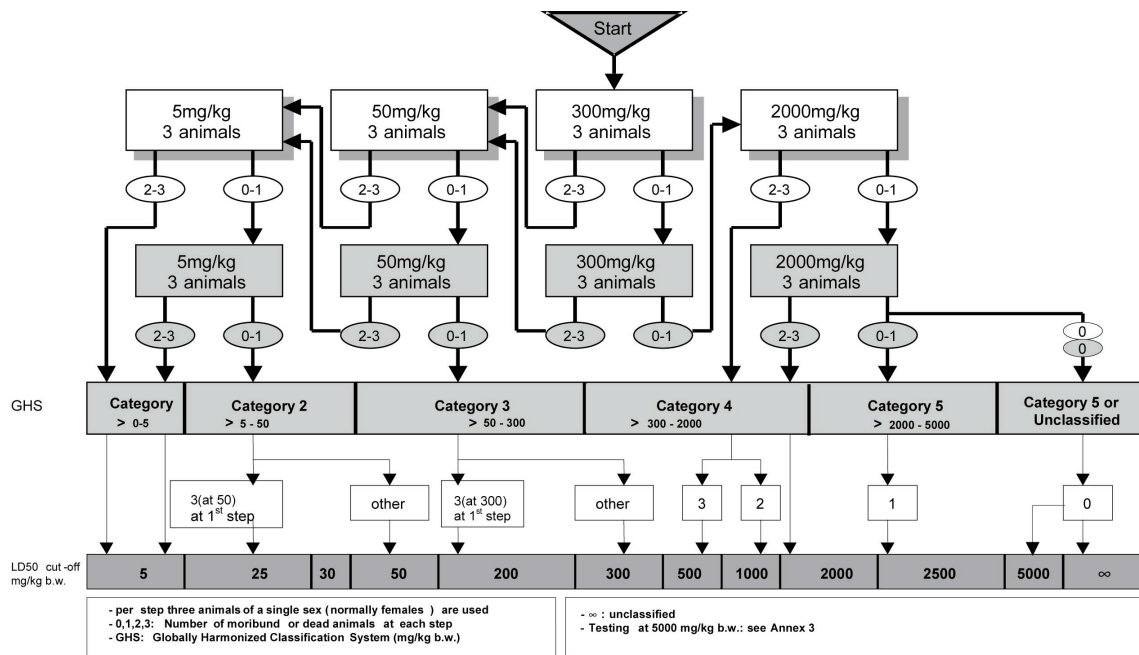


Abb. 16: OECD Test No. 423: Acute Oral Toxicity

Schema aus der OECD Richtlinie für die Testung von Chemikalien 423 (133).

Nach Verabreichung der Substanzen wurde das Aussehen der Augen, des Fells, die Fellpflege, der soziale Kontakt mit anderen Mäusen, die Nahrungsaufnahme, sowie das allgemeine Verhalten der behandelten Tiere mindestens einmal täglich untersucht. Das Gewicht der Versuchstiere wurde vor Beginn der Behandlung und anschließend in wöchentlichem Abstand gemessen. Nach Ablauf der Beobachtungsphase von 14 Tagen wurden die Versuchstiere per zervikaler Dislokation getötet.

Material

DMSO

Sigma; D4540

Schlundiernadel

FST; 18060-020

Spritze 1 mL

Dispomed; 22006

2.8.2 Untersuchung der Verabreichungsform und Dosierung

Nachdem die toxischen Eigenschaften von Tetrahydrocarbazolaminen im vorangegangenen Kapitel untersucht wurden, sollte nun die Dosierung und eine möglichst schonende Verabreichungsform identifiziert werden. So wurden die Bioverfügbarkeit und die Verteilung im Körper als maßgebliche Parameter zur Abschätzung der Tauglichkeit von gea_133 als potentiellern Arzneistoff untersucht. Das Ziel war möglichst einfache und gut verträgliche Verabreichungsformen zum Beispiel über eine orale Aufnahme zu finden. Eine gängige und bereits am Zentrum für Neuropathologie etablierte Methode ist hierbei die Lösung von Wirkstoffen in Erdnussbutter. Unter anderem sollte ermittelt werden, ob der Arzneistoff peroral verfügbar ist und die Blut-Hirn-Schranke überwindet.

2.8.2.1 Enterale Gabe von gea_133

Enterale Verabreichung mit Hilfe von Magensonden

Der Vorteil der enteralen Verabreichung mit Hilfe einer Magensonde ist, dass sichergestellt ist, dass die gesamte Menge an Testsubstanz aufgenommen wird. Anschließend kann die Absorption aus dem Gastrointestinaltrakt untersucht werden. Dafür wurde zunächst eine 1 M Stammlösung von gea_133 in DMSO hergestellt. Diese wurde mit Pflanzenöl versetzt, so dass mit einem Volumen von 150 µL eine Dosierung des Wirkstoffes von 100 mg/kg Körpergewicht erreicht wurde. Anschließend wurde gea_133 12 weiblichen C57/Bl6 Tieren im Alter von 8 Wochen verabreicht. Nach 0,5, 1, 2, 4, 8 und 24 Stunden wurden je 2 Tiere getötet, deren Blut gesammelt und das Gehirn entnommen. Diese Proben wurden bis zur anschließenden Aufbereitung (vgl. Kapitel 2.8.2.3, Seite 56) in flüssigem Stickstoff gelagert.

Enterale Verabreichung mit der Nahrung

Die Therapie von langsam fortschreitenden neurodegenerativen Erkrankungen, wie dem Morbus Alzheimer, sollte idealerweise über einen längeren Zeitraum erfolgen. Die Wirkstoffe und deren Verabreichungsform müssen daher für eine Langzeittherapie geeignet sein. Ideale Verabreichungsformen für Versuchstiere sind zum Beispiel die Gabe mit dem Trinkwasser oder Futterpellets. Der Nachteil der Verabreichung in Trinkwasser ist neben einer ungenauen Dosierung die Voraussetzung der Lösbarkeit des Wirkstoffes

in Wasser. Bei der Verabreichung mit Futterpellets sind auf Grund der Herstellungstechniken erhebliche Mengen an Wirkstoff notwendig und eine exakte Dosierung ebenfalls nicht möglich. Daher sind diese Methoden einerseits teuer, und andererseits nicht für orientierende Untersuchungen bezüglich der oralen Verfügbarkeit eines Wirkstoffes geeignet.

Am Zentrum für Neuropathologie und Prionforschung ist die Verabreichung von Wirkstoffen in Erdnussbutter etabliert. Daher wurde zunächst diese Art der Wirkstoffverabreichung gewählt. Alle Versuchstiere wurden über 3 Tage an die tägliche Gabe von Erdnussbutter gewöhnt, da Mäuse im Allgemeinen unbekannter Nahrung gegenüber sehr misstrauisch sind (134). Anschließend wurden 52 µL der Stammlösung (1M gea_133 in DMSO) mit 2 g Erdnussbutter vermischt und den einzeln gehaltenen Tieren zum Fressen gegeben.

Um eventuelle Probleme auf Grund eines möglichen Geruchs des Wirkstoffes auszuschließen, wurde in einem weiteren Versuch die Erdnussbutter zunächst mit 10 µL Phenethylacetat (Apfelaroma) aromatisiert und anschließend mit gea_133 versetzt. Das restliche Vorgehen verlief analog zu dem Versuch mit nicht zusätzlich aromatisierter Erdnussbutter.

Eine weitere Möglichkeit Medikamente über die Nahrung zu verabreichen ist die Gabe mittels gesüßter und aromatisierter Gelatine (135). Im Gegensatz zu der Verabreichung mit Erdnussbutter werden weniger Kalorien zugeführt und es besteht nicht die Problematik, dass lipophile Moleküle aus der Matrix (Erdnussbutter) eventuell nur schlecht resorbiert werden können. In Anlehnung an Zhang et al. wurde gea_133 in Dr. Oetker Götterspeise mit Himbeer-Geschmack gemischt und laut Anweisung des Herstellers verarbeitet. So wurden 3,125 g Fertigpulver mit 100 mL Wasser erwärmt, mit der Stammlösung (1M gea_133 in DMSO) versetzt und je 2 mL in eine 24 well Platte gefüllt und über Nacht bei 4°C ausgehärtet (vgl. Abb. 17A, Seite 53).

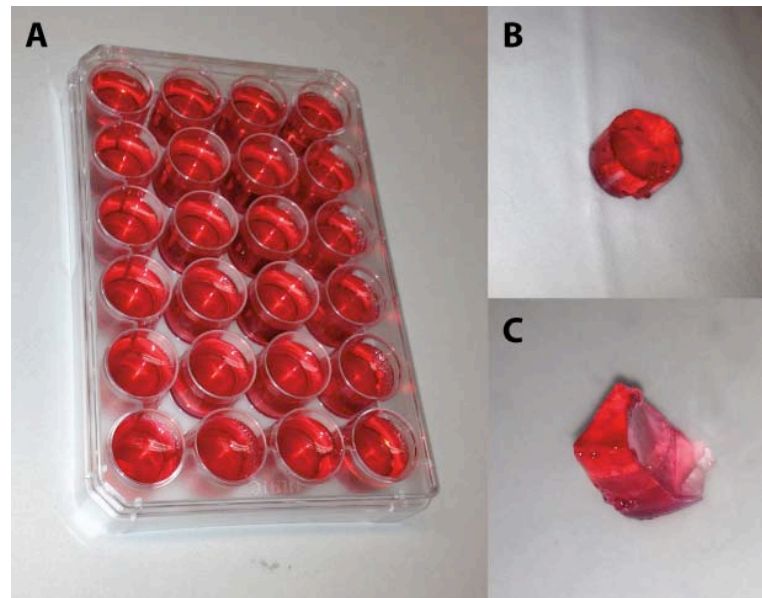


Abb. 17: Repräsentative Bilder der mit Wirkstoff versetzten Gelatine

A: Gelatine in 24 well Platte. **B:** Gelatine die aus der Form entnommen worden ist. **C:** Menge an Gelatine (1/8) pro Maus.

Jeder einzelne dieser Gelatine-Zylinder wurde anschließend in 8 Stücke zerteilt (vgl. Abb. 17C, Seite 53) und den Mäusen, die bereits an Gelatine ohne Wirkstoff gewöhnt waren, verabreicht.

Material

Apfelaroma (Phenethylacetat)	Sigma; W285706
DMSO	Sigma; D4540
Erdnussbutter Barney's Best Creamy	Dockhorn & Co (Hamburg)
Götterspeise Himbeer-Geschmack	Dr. Oetker
Schlundiernadel	FST; 18060-20
Spritze 1 mL	Dispomed; 22006
Steriles, deionisiertes Wasser	VE-Wasser autoklaviert

2.8.2.2 Parenterale Gabe von gea_133

Ein Wirkstoff ist im Magen-Darm-Trakt vielfältigen Einflüssen unterzogen. So kann der Wirkstoff beispielsweise durch die Magensäure angegriffen werden oder ist eventuell schlecht aus dem Dünndarm resorbierbar. Für einen Vergleich zur enteralen Verabreichung wurde daher die parenterale Gabe von gea_133 untersucht. Die klassischen parenteralen Verabreichungswege umfassen die intravenöse, subkutane, intraperitoneale und intramuskuläre Injektion.

Intraperitoneale und subkutane Verabreichung

Bei Mäusen bietet sich vor allem die intraperitoneale und subkutane Verabreichung an, da eine intravenöse Verabreichung oft zu Verletzungen der Tiere führt. 50 µL der 1M Stammlösung von gea_133 wurden mit 950 µL DMSO gemischt. 100 µL dieser Lösung wurde 8 Wochen alten weiblichen C57/BL6 Tieren entweder intraperitoneal (i.p.) oder subkutan (s.c.) verabreicht. Nach 0,5, 1, 2, 4, 8 und 24 Stunden wurden je 2 Tiere getötet, deren Blut gesammelt und die Gehirne entnommen. Diese Proben wurden anschließend für die weitere Vermessung aufbereitet (vgl. Kapitel 2.8.2.3, Seite 56).

Subkutane Verabreichung mit Hilfe von osmotischen Pumpen (ALZET®)

Die tägliche parenterale Applikation von Lösungen übt einen nicht unwesentlichen Stress auf die Versuchstiere aus und ist somit maximal über 2 Monate durchzuführen. Daher wurde die Verabreichung mittels osmotischer Minipumpen (ALZET®) untersucht. ALZET® Pumpen sind kleine, subkutan implantierbare Infusionssysteme, mit denen Testsubstanzen verschiedenen Versuchstieren (Mäuse, Ratten, etc.) verabreicht werden können. Auf Grund der vollständigen Implantation der Pumpe ist der Bewegungsspielraum der Tiere nicht eingeschränkt und eine Einzelhaltung nicht notwendig. ALZET® Pumpen funktionieren über ein rein osmotisches System, spezielle Anforderungen an den Wirkstoff sind somit nicht gegeben (136). Die Pumpen sind nach Größe und Förderleistung in verschiedene Modelle eingeteilt.

Zunächst wurde die osmotische Pumpe Model 2006 verwendet. Diese Pumpe besitzt ein Durchschnittsvolumen von 200 µL und ist in der Lage mit einer Förderleistung von 0,15 µL/h einen Wirkstoff über einen Zeitraum von bis zu 6 Wochen konstant abzugeben (137). Bei den bisherigen Versuchen zur parenteralen Verabreichung wurde gea_133 in

100% DMSO gelöst und appliziert. Die physikalischen Eigenschaften der Pumpe gewährleisten eine korrekte Durchlässigkeit der semipermeablen Pumpenmembran nicht bei 100% DMSO, sondern nur bis zu einer Konzentration von maximal 50%. Auf Grund der Lipophilie des Moleküls ist gea_133 jedoch weder direkt in wässrigen Lösungsmitteln lösbar, noch die Stammlösung in DMSO mit solchen mischbar. Laut Anweisung des Herstellers der Pumpe ist allerdings die Vermengung mit Polyethylenglykol 300 möglich. Mit PEG 300 konnte die Stammlösung zu gleichen Teilen gemischt werden. Die Pumpe wurde, nachdem sie mit der Wirkstofflösung (500 µL 1M gea_133 in DMSO + 500 µL PEG 300) gefüllt worden war, über 60 Stunden in steriler, isotoni-scher Kochsalzlösung bei 37°C vorbereitet. Hiermit überbrückt man die Anlaufzeit des osmotischen Pumpensystems und gewährleistet so eine lineare Wirkstoffabgabe ab dem Zeitpunkt der Implantation der Pumpe. Im Anschluss daran wurde weiblichen C57/Bl6 Mäusen je eine Pumpe subkutan implantiert. Dazu wurden die Mäuse mit Ketamin (0,13 mg/kg Körpergewicht) und Xylazin (0,01 mg/kg Körpergewicht) durch intraperitoneale Injektion narkotisiert. Nach Erreichen der nötigen Narkosetiefe wurde die Im-plantationsstelle rasiert und gewaschen. Ein kleiner Hautschnitt am Rücken des Tieres wurde direkt neben der Stelle gesetzt, an der anschließend die Pumpe implantiert wor-den ist. In den Einschnitt wurde eine Arterienklemme eingeführt und vorsichtig eine Tasche für die Pumpe geformt. Die mit Wirkstoff gefüllte Pumpe wurde in die Tasche geschoben. Die Wunde wurde anschließend mit Wundclips verschlossen. Nach der Ope-ration wurde der Maus zur Schmerzprophylaxe Remadyl (4 mg/kg KG, subkutan) ap-pliziert. Um zunächst die Spiegel von gea_133 in Blut und Gehirn nachzuweisen, wur-den 4 Tage nach der Operation 3 Tiere mittels zervikaler Dislokation getötet. Deren Blut und Gehirn wurde gesammelt und für die weitere Vermessung aufbereitet (vgl. Kapitel 2.8.2.3, Seite 56).

Bei späteren Experimenten wurde die osmotische Pumpe Model 2002 verwendet. Diese Pumpe besitzt ein Durchschnittsvolumen von 200 µL und ist in der Lage, mit einer För-derleistung von 0,5 µL/h den Wirkstoff über einen Zeitraum von bis zu 2 Wochen kon-stant abzugeben (138). Auch hier wurde die Pumpe analog dem Modell 2006 für eine lineare Abgaberate über Nacht in steriler, isotonischer Kochsalzlösung bei 37°C vorbe-reitet. Die Implantation wurde wie bei der Pumpe 2006 beschrieben vorgenommen. 4 Tage nach der Operation wurden 3 Tiere mittels zervikaler Dislokation getötet. An-

schließlich wurde Blut und Gehirn gesammelt und für die weitere Vermessung aufbereitet (vgl. Kapitel 2.8.2.3, Seite 56).

Material

ALZET Pumpe 2002	Alzet; 0000296
ALZET Pumpe 2006	Alzet; 0007223
DMSO	Sigma; D4540
Isotonische Kochsalzlösung 0,9%	Braun
Kanüle 27G	Terumo Neolus; NN-2719R
Ketamin	Inresa; 4205
Schlundiernadel	FST; 18060-20
Spritze 1mL	Dispomed; 22006
PEG 300	AppliChem; A5537
Reflex Clips	Alzet; 0009971
Reflex Applikator	Alzet; 0009974
Reflex Remover	Alzet; 0009976
Remadyl (Carprofen)	Pfizer
Rompun (Xylazin)	Bayer

2.8.2.3 Probennahme und Aufarbeitung

Für die Bestimmung des Verlaufs der Wirkstoffspiegel von gea_133 musste Blut und Gehirn der Versuchstiere gesammelt werden. Hierfür wurden die Mäuse zunächst mit Ketamin (0,13 mg/kg Körpergewicht) und Xylazin (0,01 mg/kg Körpergewicht) per intraperitonealer Injektion narkotisiert. Die Bauchdecke wurde durch einen Median-schnitt bis zum Sternum geöffnet und der Thoraxraum, nach Durchtrennen der Rippen auf beiden Seiten, freigelegt. Als nächstes wurden die dorsalen Blutgefäße gekappt und das auslaufende Blut gesammelt. Um eine Koagulation des Blutes zu verhindern wurde

das gesammelte Blut mit Heparin beschichteten Kügelchen (aus S-Monovette; Sarstedt) versetzt. Nun wurde die linke Herzkammer durch eine Flügelkanüle für etwa 10 Minuten mit PBS gespült, bis die Blutgefäße und Organe weitestgehend blutleer waren. Das Gehirn wurde vorsichtig entnommen und, ebenso wie das gesammelte Blut, in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bis zur weiteren Aufarbeitung bei -20 °C asserviert.

Für die Bestimmung von gea_133 aus Blut beziehungsweise Gehirn wurde auf die gleiche Art und Weise vorgegangen, das Gehirn wurde jedoch zunächst mit einem motorbetriebenen Pistill (Pellet Pestle; Sigma) homogenisiert. Die für die Aufarbeitung gewählte dispersive Festphasenextraktion wurde an die von Plössl et al. etablierte Methode angelehnt (139). Als erster Schritt erfolgte eine Extraktion mit Acetonitril und Trocknung durch wasserfreies Magnesiumsulfat. Anschließend wurde der Extrakt mit Bondesil® PSA weiter aufgereinigt. 500 µl Blut oder Hirnhomogenat wurden mit 125 mg Natriumchlorid, 250 mg wasserfreiem Magnesiumsulfat und 1000 µl Acetonitril versetzt und für 1 Minute mittels Vortex geschüttelt. Nach Zentrifugieren bei 15000 rpm für 5 Minuten wurden 1000 µL des Überstandes mit 12,5 mg Bondesil® PSA und 12,5 mg Magnesiumsulfat versetzt. Nach erneutem Schütteln für 1 Minute mittels Vortex wurde wiederum für 5 Minuten bei 15000 rpm zentrifugiert und der Überstand mittels GC-MS untersucht.

Material

Acetonitril	VWR; 83639.320
Flügelkanüle	Venisystems; P296A05
Bondesil PSA, 40 µM	Agilent Technologies; 12213023
DMSO	Sigma; D4540
S-Monovette (66x11mm)	Sarstedt; 05.1553
Kanüle 27G	Terumo Neolus; NN-2719R
Ketamin	Inresa; 4205
Magnesiumsulfat	Merck; 106067
Natriumchlorid	VWR; 27810295

PBS	PAN Biotech; P04-36500
Pellet Pestle	Sigma; Z359971-1EA
Pinzette	FST; 11018-12; 11293-00
Schere	FST; 91460-11
Spritze 1mL	Dispomed; 22006
Remadyl (Carprofen)	Pfizer
Rompun (Xylazin)	Bayer
Vortex Genie 2	Scienitfic Industries; G-560E
Zentrifuge	Eppendorf; 5415 R

2.8.2.4 Gaschromatographie-Massenspektrometrie (GC-MS)

Die Gewinnung und Aufarbeitung der Proben von Blut und Gehirn wurde im letzten Kapitel beschrieben. Anschließend sollte die Konzentration von *gea_133* in diesen mittels Gaschromatographie-Massenspektrometrie bestimmt werden. Bei der Gaschromatographie mit Massenspektrometrie-Kopplung wird ein Gaschromatograph, der der Auftrennung des zu untersuchenden Stoffgemisches dient, mit einem Massenspektrometer zur Identifizierung und Quantifizierung der einzelnen Komponenten gekoppelt. Die Trennsäule im Gaschromatographen trennt die einzelnen Komponenten je nach Polarität und Flüchtigkeit auf. Bei der Massenspektrometrie werden diese neutralen Komponenten dann in Ionen überführt (Fragmentierung) und können über ihr Masse-zu-Ladungsverhältnis (m/z) aufgetrennt und detektiert werden. Im Gegensatz zu IR- oder NMR-Spektroskopie wird der Analyt bei der Messung verbraucht, es handelt sich also nicht um eine zerstörungsfreie Methode.

Die Untersuchung der gesammelten und aufbereiteten Proben (vgl. Kapitel 2.8.2.3, Seite 56) wurde von Christoph Müller im Department für Pharmazie der Ludwig-Maximilians-Universität München im Arbeitskreis von Prof. Dr. Franz Bracher in Anlehnung an die von Plössl et al. entwickelte Methode durchgeführt (139). Es wurden einzelne, ausgesuchte m/z -Verhältnisse (*single ion monitoring*; SIM) aufgenommen, da dies die Nachweisgrenze um bis zu 2 Größenordnungen, über eine Optimierung des

Signal-zu-Rausch-Verhältnisses, verbessert und eine Quantifizierung über die Signalflächen ermöglicht.

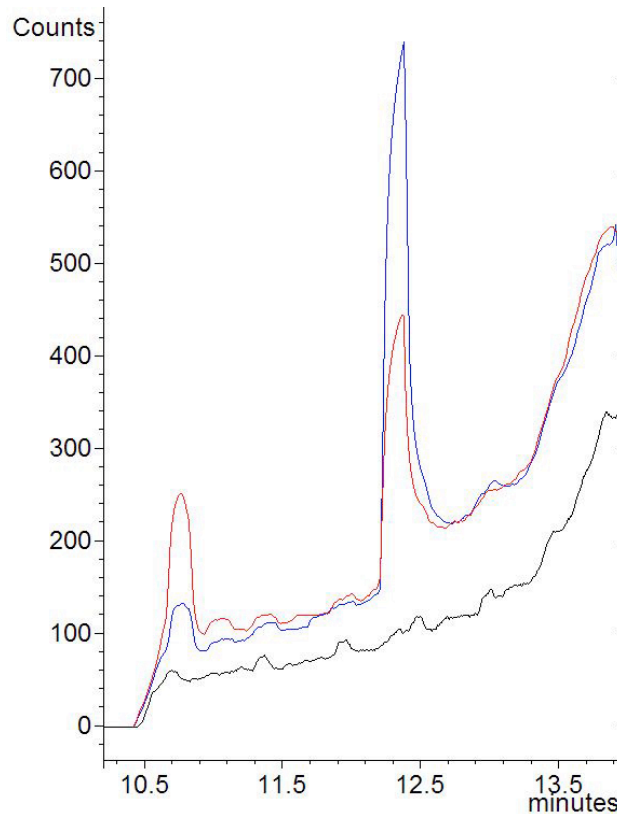


Abb. 18: GC-MS-Chromatogramm von gea_133

Angegeben ist das Chromatogramm von Blindwert (schwarz), Probenlösung Gehirn (blau) und Probenlösung Blut (rot). Der Peak bei einer Retentionszeit von 12,3 Minuten repräsentiert gea_133.

Bei einer Injektortemperatur von 220°C wurde 1 µL der Probe in den Injektor injiziert. Das Temperaturprotokoll startete mit 65 °C über 1,5 Minuten und heizte dann mit einer Aufheizrate von 20 °C pro Minute auf 300 °C auf. Es folgte eine weitere Aufheizung, diesmal mit 50 °C pro Minute, bis die Endtemperatur von 320 °C erreicht wurde, welche dann für 4,35 Minuten gehalten wurde. Insgesamt dauerte ein Lauf 18 Minuten. Die Substanz gea_133 besitzt eine Retentionszeit von 12,3 Minuten (vgl. Abb. 18, Seite 59). Für die Detektion wurde das Hauptfragment ($m/z = 193$) herangezogen.

2.8.3 Therapiestudie

In den vorangegangenen Kapiteln wurden die Untersuchung der akuten Toxizität, die Dosisfindung und die ideale Verabreichungsform von gea_133 beschrieben. Aufbauend auf diesen Daten kann nun die Beschreibung der Experimente zur Untersuchung des therapeutischen Potentials von gea_133 erfolgen.

2.8.3.1 Mausmodelle

Im Rahmen des Therapieversuches sollte untersucht werden, ob der Wirkstoff gea_133 einen Effekt auf die Anzahl und Größe von Amyloid-Plaques besitzt. Als transgene Mausmodelle wurden die Linien APPPS1 Δ E9 und APPPS1 ausgewählt. Diese Mauslinien unterscheiden sich vor allem in dem Zeitpunkt ab dem das Auftreten von Plaques beobachtet werden kann und in der Geschwindigkeit mit der neue Plaques auftreten, beziehungsweise an Größe zunehmen.

APPPS1 Δ E9

Das Mausmodell APPPS1 Δ E9 (B6.Cg-Tg(APP695)3Dbo Tg(PSEN1dE9)S9Dbo/J) koexprimiert die APP-Mutante APP_{swe} mit einer PS1-Mutante, in welcher das Exon 9 entfernt ist (140). Beide Transgene werden unter Kontrolle des Prion-Promotors exprimiert und liegen auf einem Chromosomen-Lokus, wodurch beide Transgene wie ein einzelnes vererbt werden. In Folge dessen ist der Nachweis von einem Transgen bei der Genotypisierung ausreichend (Primer: IMR 1644: AAT AGA GAA CGG CAG GA und IMR 1645: GCC ATG AGG GCA CTA AT). Für die hier beschriebenen Versuche wurden ausschließlich heterozygote Tiere verwendet. Erste Amyloidablagerungen treten im Alter von 4-5 Monaten auf. Ab einem Alter von 18 Monaten manifestieren sich zusätzliche Defizite im cholinergen System (141, 142).

APPPS1

Das Mausmodell APPPS1 (B6-Tg(Thy1-APP_{swe}; Thy1-PS1 L166P)) koexprimiert die APP-Mutante APP_{swe} mit der PS1-Mutante L166P auf reinem C57/Bl6 Hintergrund (143). Beide Transgene werden über den neuronalen Promotor Thy1 exprimiert und liegen auf einem Chromosomen-Lokus. Daher werden beide Transgene gemeinsam ver-

erbt und der Nachweis von einem Transgen bei der Genotypisierung ist ausreichend (Primer: IMR 7303: TCT GAG TGG CAA AGG ACC TTA GG und IMR 9296: CGC TGA ACT TGT GGC CGT TTA CG). Für die hier beschriebenen Versuche wurden ausschließlich heterozygote Tiere verwendet. Diese Linie zeigt ein Auftreten erster A β -Plaques bereits ab einem Alter von 6 bis 8 Wochen (143).

2.8.3.2 Plaquedichte

Für die Bestimmung der Plaquedichte wurden zunächst 7 Monate alte Männchen beider Mauslinien dreimal pro Woche mittels intraperitonealer Injektion behandelt. Dabei wurde den Tieren entweder gea_133 (100 mg/kg Körpergewicht in 100 μ L DMSO) oder das gleiche Volumen an Lösungsmittel (DMSO) verabreicht. In einem zweiten Versuch wurden die Tiere analog, jedoch mit einer niedrigeren Dosis von gea_133 (25 mg/kg Körpergewicht in 100 μ L DMSO) oder Lösungsmittel behandelt.

Für die anschließende immunhistochemische Untersuchung der Plaquegröße und Plaquedichte wurden die Tiere nach Ablauf der Versuchsperiode geopfert. Die Mäuse wurden zunächst mit Ketamin (0,13 mg/kg Körpergewicht) und Xylazin (0,01 mg/kg Körpergewicht) mittels intraperitonealer Injektion narkotisiert. Anschließend wurde die Bauchdecke geöffnet, der Thoraxraum freigelegt und die dorsalen Blutgefäße gekappt. Dann wurde die linke Herzkammer durch eine Flügelkanüle mit PBS für etwa 5 Minuten gespült, bis die Blutgefäße und Organe weitestgehend blutleer waren. Für die Fixierung der Organe wurde für weitere 5-10 Minuten mit 4% Paraformaldehydlösung (PFA in PBS) gespült und das Gehirn nach vorsichtiger Entnahme über Nacht bei 4 °C in 4% PFA gelagert. Die Färbung und anschließende Untersuchung der Organe erfolgte in 100 μ m dicken Schnitten (sagittal). Diese wurden mit Hilfe des Vibratomes VT1000E (Leica) angefertigt. Die folgenden Schritte fanden bei Raumtemperatur und unter ständigem Schütteln statt. Die Gehirnschnitte wurden über Nacht in 2% Triton X-100 (w/v) in PBS permeabilisiert und am nächsten Tag dreimal für 15 Minuten mit 10% Normal Goat Serum und 0,3% Triton X-100 in PBS gewaschen. Anschließend wurden die Plaques für je 15 Minuten mit Methoxy-X04 (0,01 mg/mL in PBS) (144) angefärbt, worauf ein weiterer Waschschriff (dreimal für je 15 Minuten) folgte. Nun wurden die Schnitte mit „Fluorescent Mounting Medium“ auf Objektträgern eingedeckt und bis zur Untersuchung unter Lichtausschluss bei 4 °C gelagert.

Aufnahmen der angefärbten Plaques wurden anschließend mit Hilfe des Mikroskops LSM 7 MP (Zeiss) angefertigt. Die Größe und Dichte der Plaques wurde mit der Software Imaris (Bitplane) analysiert. Hierfür wurden die aufgenommenen Bilder in die Software Imaris geladen und Anzahl und Größe der Plaques anhand eines Schwellenwertes detektiert.

Material

24 <i>well</i> Platte	Nunc; 142475
Flügelkanüle	Venisystems; P296A05
Cyano-Veneer	Haager Werlon
Deckglas 24x50mm	VWR; 631-0146
DMSO	Sigma; D4540
Fluorescent Mounting Medium	Dako; S3023
Imaris 7.6.0	Bitplane
Kanüle 27G	Terumo Neolus; NN-2719R
Ketamin	Inresa; 4205
Mikroskop LSM 7 MP	Zeiss
Methoxy-X04	Boris Schmidt; TU Darmstadt
Normal Goat Serum	Dako; X0907
Objektträger Superfrost Plus	Thermo Scientific; J1800AMNZ
Paraformaldehyd	Sigma; 158127
PBS	PAN Biotech; P0436500
Pinzette	FST; 11018-12; 11293-00
Rompun (Xylazin)	Bayer
Schere	FST; 91460-11

Schüttler Titramax 1000	Heidolph; 544-12200-00-3
Triton X-100	Sigma; T-9284
Vibratom VT1000S	Leica
W Plan Apochromat 20x/1.0 DIC	Zeiss; 421452-9980
ZEN 2010	Zeiss; Version 6.0

2.8.4 Histopathologische Untersuchungen an Gewebeschnitten

Eine histologische Untersuchung ist notwendig, um eventuelle Auswirkungen des getesteten Wirkstoffes auf die Struktur der Organe zu untersuchen. Hierfür wurden die Organe der perfundierten Mäuse (siehe Kapitel 2.8.3.2) über Nacht in 4% Paraformaldehydlösung (PFA) in PBS bei 4 °C fixiert. Als nächstes wurden die Organe in Paraffin eingebettet und in circa 4 µm dicke Scheiben geschnitten. Diese wurden mit der Standard Hämatoxylin-Eosin-Färbung (HE) behandelt. Anschließend wurden mit dem Mikroskop Olympus Bx41, der Kamera Olympus SC30 und der Software cellSens Standard 1.6 (Olympus) repräsentative Aufnahmen der Histologie der einzelnen Organe erstellt.

3 Ergebnisse

Auf der Suche nach einem neuen Wirkstoff für die Therapie des Morbus Alzheimer wurden 20000 kleine Moleküle in einem Hochdurchsatzscreening untersucht (120). Die dabei generierte, relativ große Datenmenge musste nun systematisch untersucht und geordnet werden. Zunächst wurden sämtliche Verbindungen mit einem einheitlichen Codesystem versehen und die verfügbaren Daten in ein einheitliches Format gebracht. Dies ermöglichte den Import der Daten in die Datenbank ChemBioFinder (Cambridge-soft), so dass alle Daten an einem zentralen Punkt gespeichert und miteinander verglichen werden konnten. So war es möglich die einzelnen Strukturen gezielt nach verschiedenen Kriterien, wie zum Beispiel der Wirksamkeit, zu ordnen.

3.1 Struktur-Aktivitäts-Beziehungen

Die Analyse von Struktur-Aktivitäts-Beziehungen macht es notwendig die einzelnen Substanzen nicht nur zu ordnen, sondern auch die Zusammenhänge und strukturellen Gemeinsamkeiten herauszuarbeiten. Dafür wurden die erhobenen Daten zu den untersuchten Molekülen sowie deren Strukturinformationen aus der Datenbank ChemBioFinder exportiert und zur weiteren Analyse in die Software DataMiner von Tripos importiert. Diese Software gruppiert Substanzen mit ähnlicher chemischer Struktur zu Clustern und ermöglicht dadurch die Identifizierung von möglichen Leitstrukturen. Anschließend kann untersucht werden, ob bestimmte Reste an einem chemischen Grundkörper einen beobachteten Effekt verstärken oder abschwächen. Dafür werden in einem Cluster aktive und inaktive Substanzen dargestellt. So sind bereits erste Einblicke in die Struktur-Aktivitäts-Beziehungen der identifizierten Leitstrukturen möglich.

Die so erstellten Cluster werden in einer SAR-Karte anhand ihrer Ähnlichkeit räumlich verteilt (siehe Abb. 19, Seite 65). Jedes Symbol repräsentiert einen Cluster, wobei die Größe des Symbols mit der Anzahl aller Substanzen pro Cluster korreliert. Cluster mit Substanzen ähnlicher chemischer Struktur werden näher aneinander angeordnet als Cluster deren Substanzen sich stärker unterscheiden.

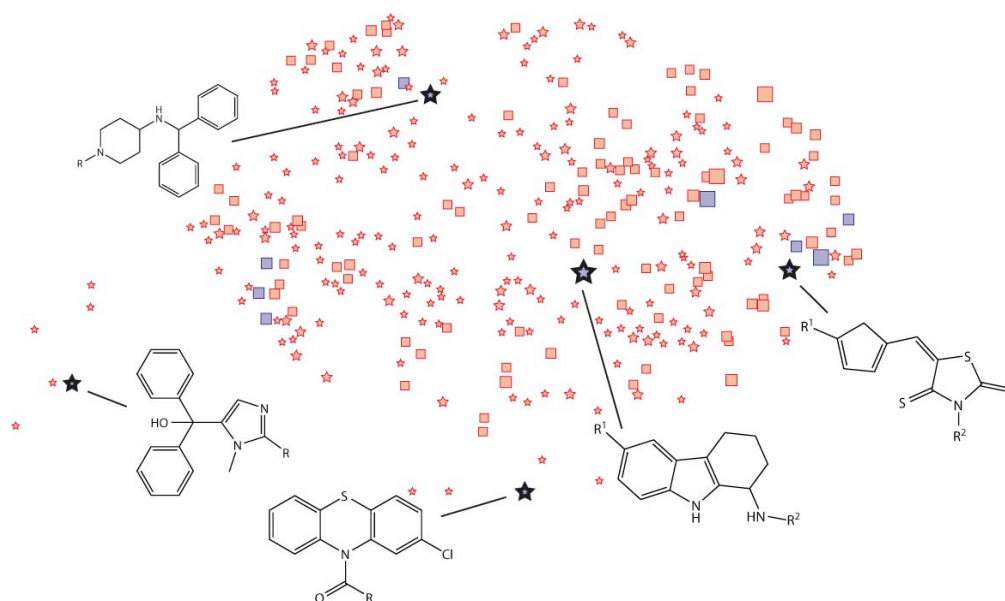


Abb. 19: Cluster aus dem primären Kalziumscreen mit den 5 identifizierten Leitstrukturen

Die Größe der Symbole repräsentiert die Anzahl aller Moleküle des jeweiligen Clusters. Cluster mit mehr als 4 wirksamen Strukturen sind blau eingefärbt. Befinden sich weniger als 4 wirksame Strukturen darin, wird der Cluster rot eingefärbt. Cluster die mehr als 50% wirksame Substanzen enthalten werden durch einen Stern repräsentiert, jene die weniger wirksame Strukturen enthalten durch ein Quadrat.

Wenn ein Cluster mehr als 4 wirksame Strukturen enthält, wird er blau eingefärbt, andernfalls rot. Um die Verteilung und Anzahl der Hits in den Clustern noch deutlicher darzustellen wird zusätzlich zur Farbe auch die Form der Symbole für die Cluster geändert. So werden Cluster mit mehr als 50% wirksamen Substanzen durch einen Stern dargestellt, solche mit weniger als 50% durch ein Quadrat (siehe Abb. 19, Seite 65). Aus den 20000 untersuchten Molekülen konnten 5 vielversprechende Strukturtypen von Leitstrukturen identifiziert werden.

Ein wesentlicher Gesichtspunkt bei der Wahl der weiter zu entwickelnden Leitstruktur und deren Derivate ist die Patentsituation. Denn nur auf der Basis eines ausreichenden Patentschutzes einer Struktur ist eine spätere Kooperation mit der Pharmaindustrie, ohne die eine Wirkstoffentwicklung für diese Erkrankung unrealistisch ist, realisierbar. Für eine erfolgreiche Patentierung ist es notwendig nachzuweisen, dass eine Erfindung gewerblich anwendbar und neu ist, sowie eine erfinderische Tätigkeit vorliegt. Ein Arzneimittel für die Therapie des Morbus Alzheimer ist mit Sicherheit gewerblich anwendbar, die Neuheit und erfinderische Tätigkeit gilt es jedoch darzulegen. Daher wurde für die identifizierten Leitstrukturen eine erste Struktursuche mit der Suchmaschine

SciFinder (American Chemical Society) durchgeführt. Hierbei läuft die Suche anhand generischer Strukturformeln (Markush-Formel) ab, so dass nicht nur Informationen über die gesuchte Struktur, sondern auch Patente oder Veröffentlichungen zu strukturell verwandten Substanzen angezeigt werden können. Laut SciFinder sind so nahezu sämtliche öffentlich verfügbaren Informationen für eine gesuchte Substanz recherchierbar. Die zu den Leitstrukturen gehörenden Moleküle und die Ergebnisse der Suche mit Hilfe von SciFinder sind für die identifizierten Leitstrukturen in den folgenden Kapiteln dargestellt.

3.1.1 Thiazolidin-Cluster

Der Thiazolidin-Cluster enthält 7 Verbindungen, die in der Lage sind, die Freisetzung von Kalzium aus dem ER auf 70-82% im Vergleich zu Kontrollbedingungen zu senken (vgl. Abb. 20, Seite 66). Die in der Substanzbibliothek DIVERSet enthaltenen Thiazolidine zeigen untereinander keine nennenswerten Unterschiede in ihrer Aktivität.

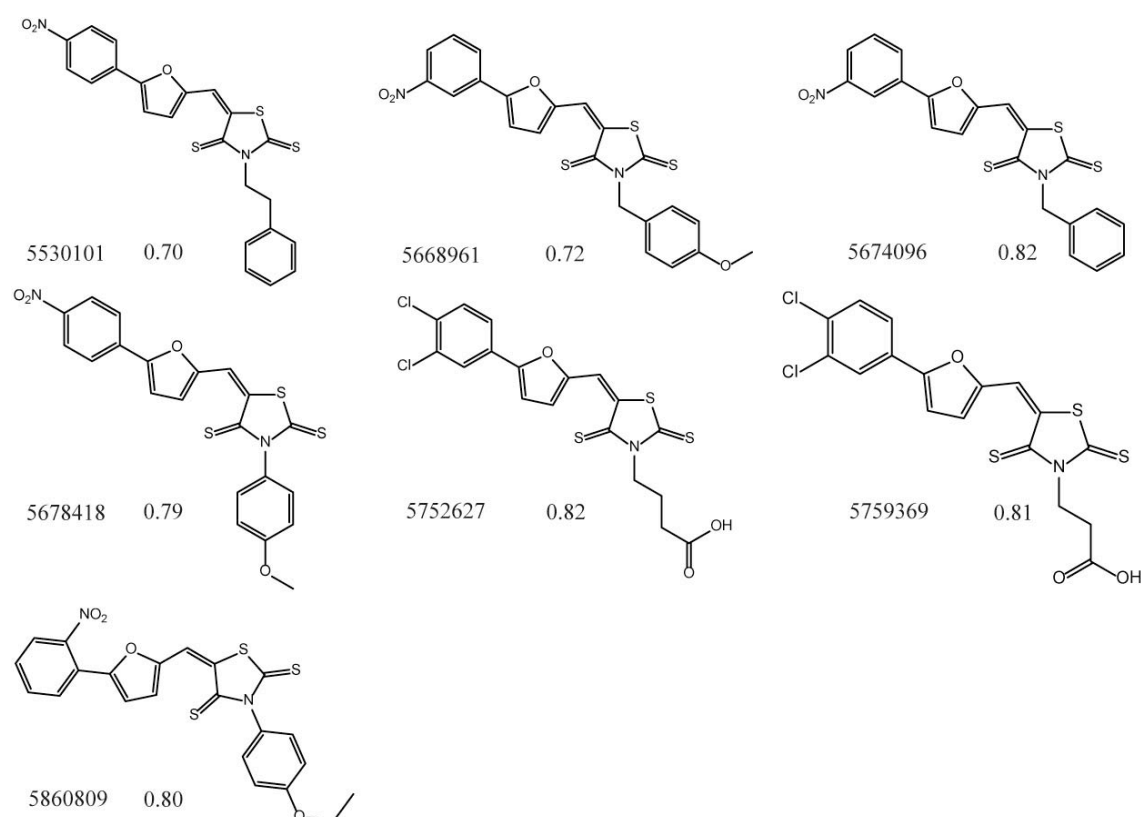


Abb. 20: Vertreter der Leitstruktur der Thiazolidine

Zu sehen sind die Molekülstruktur, ID und der gemessene normalisierte Kalziumausstrom aus dem ER.

Die Recherche nach der Patentierbarkeit der Thiazolidine ergab, dass strukturell sehr ähnliche Thiazolidine bereits als TNF-Inhibitoren patentiert sind (145). In Abb. 21, Seite 67 ist die generische Strukturformel der patentierten Substanzen dargestellt.

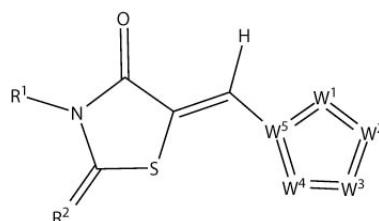


Abb. 21: Generische Strukturformel von patentierten TNF-Inhibitoren

Diese generische Strukturformel entstammt dem Patent von WANG et. al (145). W¹⁻⁵ stellt einen heterocyclischen aliphatischen oder aromatischen Ring dar, der eventuell substituiert ist. R² ist als S oder O definiert. Mögliche Reste für R¹ decken das gesamte chemische Spektrum ab.

Interessanterweise konnte unabhängig von diesem Patent gezeigt werden, dass eine Inkubation mit TNF α in Zellkultur (*human tracheal smooth muscle cells* (TSMC)) den durch Carbachol hervorgerufenen Kalziumeinstrom in das Zytosol erhöht. Diese Aktivierung wird vor allem über den TNF α -p55 Rezeptor vermittelt (146). Hierin liegt auch eine mögliche Erklärung für den Effekt der hier untersuchten Thiazolidine auf die Freisetzung von Kalzium aus dem ER. Es könnte sein, dass diese Substanzen über eine Hemmung von TNF-Rezeptoren die Freisetzung von Kalzium modulieren.

Es war vornehmlich in unserem Interesse eine Leitstruktur zu identifizieren, die im Rahmen eines Patentes einen Substanzschutz erlangen kann. Der Substanzschutz einer Verbindung stellt den höchstmöglichen patentrechtlichen Schutz dar, da er jegliche Verwendung dieser Substanz abdeckt. In Folge der Patentierung von sehr ähnlichen Strukturen für die Verwendung als Arzneimittel wäre es lediglich möglich, die Verwendung für die Therapie von neurodegenerativen Erkrankungen schützen zu lassen. Daher wurde die Strukturklasse der Thiazolidine in der hier vorliegenden Arbeit nicht weiter untersucht.

3.1.2 Benzhydrylpiperidinamin-Cluster

Eine weitere Leitstruktur ist die der Benzhydrylpiperidinamine. Hier konnten vier Vertreter identifiziert werden, die den Kalziumspiegel im Zytosol um bis zu 50% im Vergleich zu Kontrollbedingungen senken (vgl. Abb. 22, Seite 68).

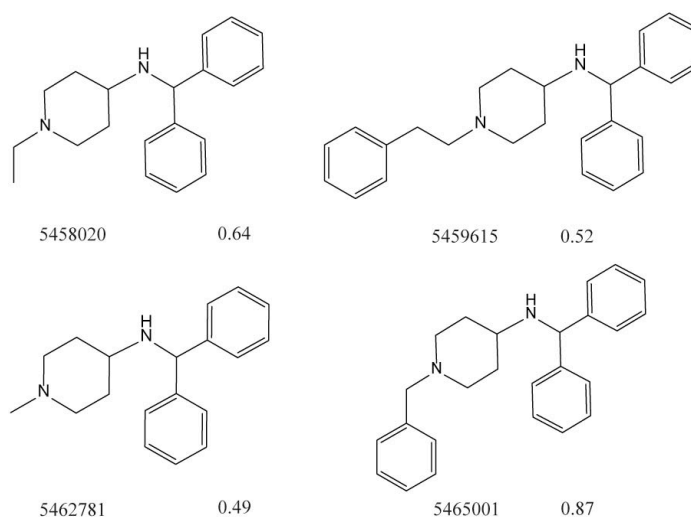


Abb. 22: Vertreter der Leitstruktur der Benzhydrylpiperidinamine

Zu sehen sind die Molekülstruktur, ID und der gemessene normalisierte Kalziumausstrom aus dem ER.

Anscheinend führt die Substitution des Piperidinringes mit einem *N*-Benzylrest zu einer Abschwächung des Effektes (vgl. Substanz 5465001). Die Aktivität ist wiederhergestellt, sobald ein größerer Abstand zwischen Piperidin und dem Aromaten (*N*-Phenethylrest, Substanz 5459615) vorliegt. Eine genauere Einschätzung der Struktur-Aktivitäts-Beziehungen ist jedoch erst nach Untersuchung weiterer Derivate möglich. Bei der Recherche bezüglich der Patentierbarkeit dieser Substanzklasse zeigte sich eine große Ähnlichkeit zu einigen Antihistaminika der ersten und teilweise zweiten Generation (vgl. Abb. 23, Seite 69). Der Arzneistoff Cyclizin unterscheidet sich zum Beispiel lediglich durch ein Stickstoffatom des Piperazinringes von der Substanz 5462781.

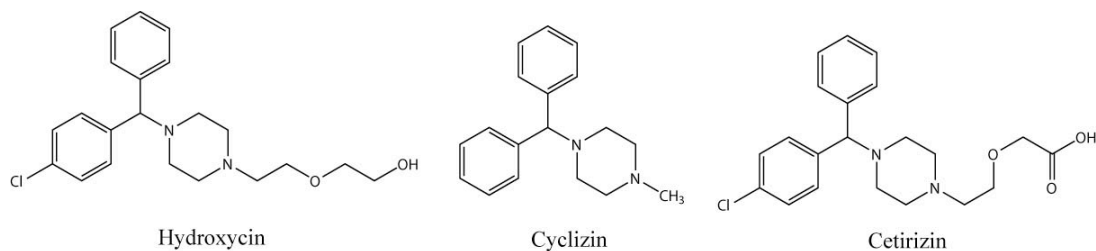


Abb. 23: Auswahl an Antihistaminika der ersten und zweiten Generation

Antihistaminika der ersten Generation, wie zum Beispiel Hydroxyzin, Cyclizine oder Diphenhydramin passieren die Blut-Hirn-Schranke und besitzen neben der hemmenden Wirkung auf die Histaminrezeptoren auch eine Reihe anderer zentralnervöser Wirkungen und Nebenwirkungen. So zeigen diese Verbindungen einen antagonistischen Effekt auf Muskarin-, Dopamin- und Serotonin-Rezeptoren (147).

Damit könnte möglicherweise auch die Wirkung der hier untersuchten Substanzen erklärt werden. Die Freisetzung von Kalzium aus dem ER wurde durch das direkt wirkende Parasympathomimetikum Carbachol induziert. Wird die antagonistische Wirkung der Antihistaminika auf muskarinerge Rezeptoren auf die hier untersuchten Benzhydrylpiperidinamine übertragen, konkurrieren diese Substanzen möglicherweise mit Carbachol um die Besetzung des Rezeptors und verringern so die Freisetzung von Kalzium aus dem ER.

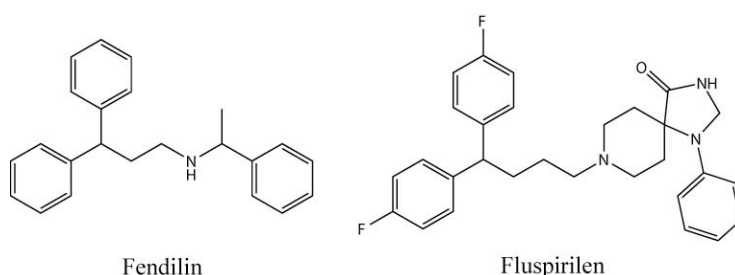


Abb. 24: Die unselektiven Kalziumkanalhemmstoffe Fendilin und Fluspirilen

Dargestellt sind die unselektiven Kalziumkanalhemmstoffe Fendilin (148) und Fluspirilen (147).

Eine weitere Möglichkeit wäre, dass Benzhydrylpiperidinamine auf Grund ihrer strukturellen Ähnlichkeit zu den unselektiven Kalziumkanalhemmstoffen Fluspirilen und Fendilin (vgl. Abb. 24, Seite 69) ebenfalls in der Lage sind Kalziumkanäle zu blockieren und somit die Freisetzung von Kalzium aus dem ER zu vermindern. Diese Theorien

müssten jedoch in weiteren spezifischeren Experimenten abgeklärt werden und sind nicht Gegenstand der hier vorliegenden Arbeit.

Auch hier ist auf Grund der großen Verbreitung ein Substanzschutz der Benzhydrilpiperidinamine im Rahmen einer Patentierung nicht möglich, weshalb diese Substanzklasse nicht weiter untersucht wurde.

3.1.3 Imidazol-Cluster

Drei Substanzen mit Imidazol-Grundstruktur konnten die Freisetzung von Kalzium aus dem ER vermindern (vgl. Abb. 25, Seite 70). Die Substitution der Imidazole mit n- oder i-Propyl-Resten weisen im Vergleich zu der Substitution mit einem Ethyl-Rest einen deutlichen Unterschied in ihrer Aktivität auf.

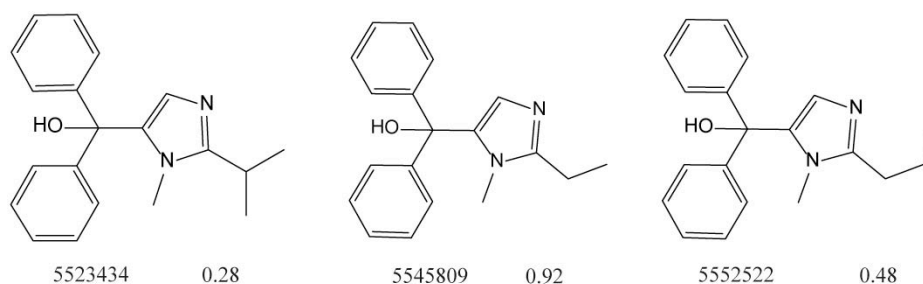


Abb. 25: Vertreter der Leitstruktur der Imidazole

Zu sehen sind die Molekülstruktur, ID und der gemessene normalisierte Kalziumausstrom aus dem ER.

Die Imidazol-Grundstruktur findet sich auch in zahlreichen auf dem Markt befindlichen Antimykotika, wie Clotrimazol oder Bifonazol (vgl. Abb. 26, Seite 70).

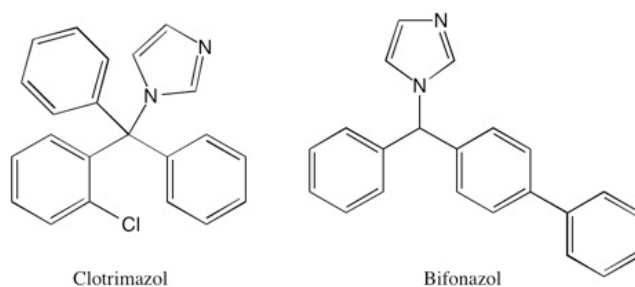


Abb. 26: Auswahl an Antimykotika mit Imidazol-Grundstruktur

Ausserdem hemmen Imidazole wegen ihrer Interaktion mit dem Häm-Eisen häufig CYP-Enzyme in der Leber und erhöhen dadurch das Risiko für Arzneistoff-Arzneistoff-Interaktionen. Zudem halten Galley et. al ein Patent inne, in dem die Wirkung von substituierten Imidazolen (vgl. Abb. 27, Seite 71) für die Behandlung von Erkrankungen des Zentralen Nervensystems beschrieben wird.

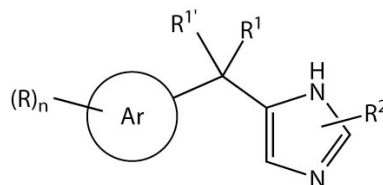


Abb. 27: Patentierte generische Strukturformel von Imidazolen für die Therapie von Krankheiten des ZNS

R¹ und R^{1'} sind unabhängig voneinander entweder H, OH, Alkyl, Alkoxy, Phenyl, Benzyl oder diese Reste mit Substituenten. R² ist als kurzketziges Alkyl definiert. Ar ist ein Aryl- oder Heteroarylring (149).

In dieser Patentschrift wird unter anderem auch die Verwendung für die Therapie des Morbus Alzheimer beschreiben, weshalb eine Patentierung der hier identifizierten Substanzen, vor allem vor dem Hintergrund der für eine Patentierung notwendigen erfinderrischen Höhe, nicht sinnvoll erschien.

3.1.4 Phenotiazin-Cluster

Der Phenotiazin-Cluster umfasst die meisten aktiven Derivate in der Substanzbibliothek (vgl. Abb. 28, Seite 72). Dennoch eignet sich auch dieser Cluster nicht für eine Patentierung, was im Folgenden dargestellt wird.

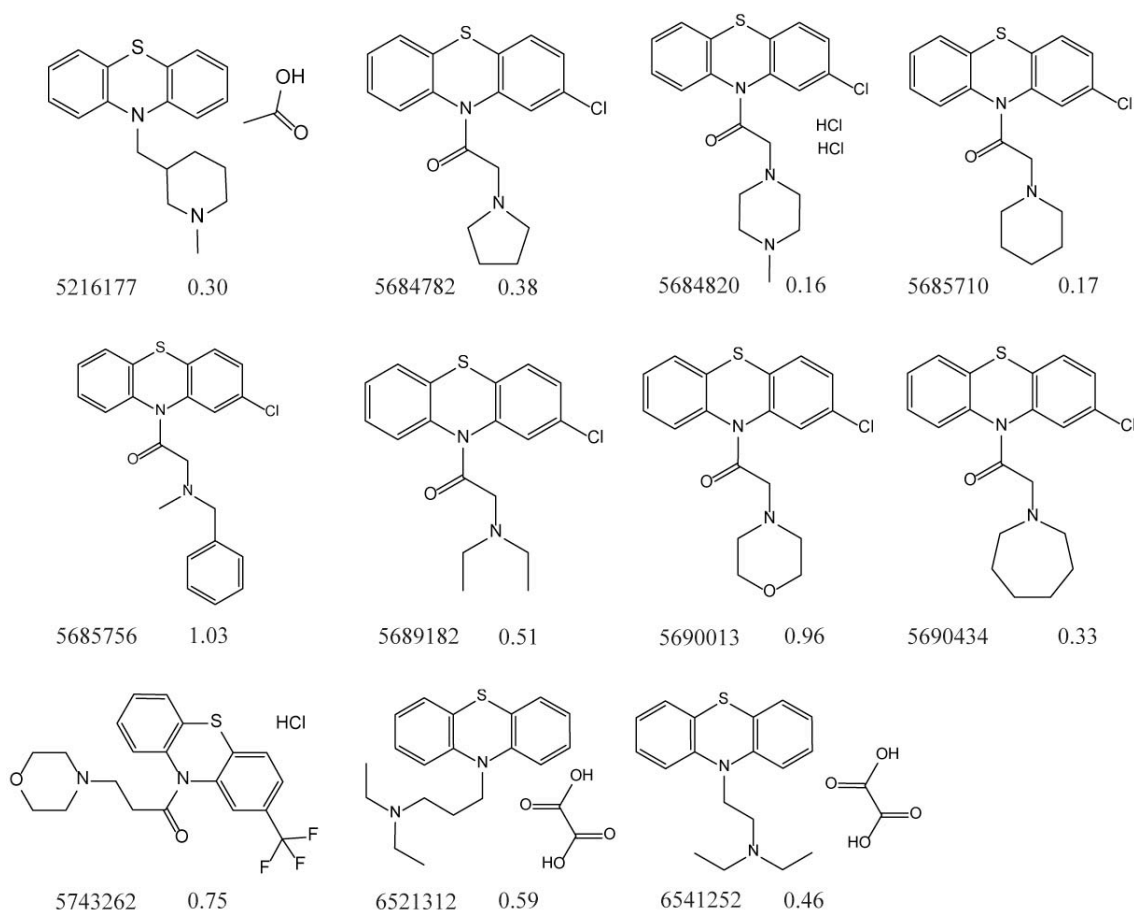


Abb. 28: Vertreter der Leitstruktur der Phenothiazine

Zu sehen sind die Molekülstruktur, ID und der gemessene normalisierte Kalziumausstrom aus dem ER.

Phenothiazine werden bereits seit langem als Arzneimittel verwendet. So wurde ein Vertreter dieser Wirkstoffklasse bereits 1930 als Wurmmittel (Anthelminthikum) eingesetzt (150). Anschließend konnten für *N*-substituierte Phenothiazine wie Promethazin und Chlorpromazin antihistaminische, sedative und/oder antipsychotische Effekte nachgewiesen werden (151). Bis heute werden Neuroleptika mit Phenothiazin-Grundkörper, wie Chlorpromazin oder Fluphenazin in der psychiatrischen Therapie eingesetzt (vgl. Abb. 29, Seite 73).

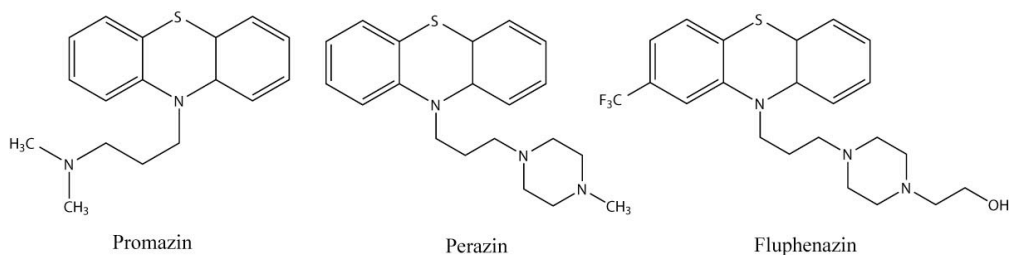


Abb. 29: Auswahl von Neuroleptika des Phenothiazin-Typs

Phenothiazine blockieren eine ganze Reihe von Rezeptoren, unter anderem auch muskarinerge M_1 -Rezeptoren (152). Analog zu den Benzhydrylpiperidinaminen wäre es möglich, dass Phenothiazine mit Carbachol um den Rezeptor konkurrieren und somit die Freisetzung von Kalzium aus dem ER in dem hier verwendeten Assay vermindern.

Auch bei dieser Strukturklasse erscheint eine Patentierung wenn überhaupt nur im Rahmen eines abhängigen Patentes möglich, weshalb keine weitere Untersuchung dieser Strukturklasse durchgeführt wurde.

3.1.5 Tetrahydrocarbazol-Cluster

Aus 20000 getesteten Verbindungen der Substanzbibliothek wurden 10 Tetrahydrocarbazolamine identifiziert (vgl. Abb. 30, Seite 74). Von den 10 identifizierten Substanzen waren 8 in der Lage, die erhöhte Freisetzung von Kalzium aus dem ER bei HEK293 Zellen mit der PS1-Mutation M146L auf physiologische Spiegel zu senken.

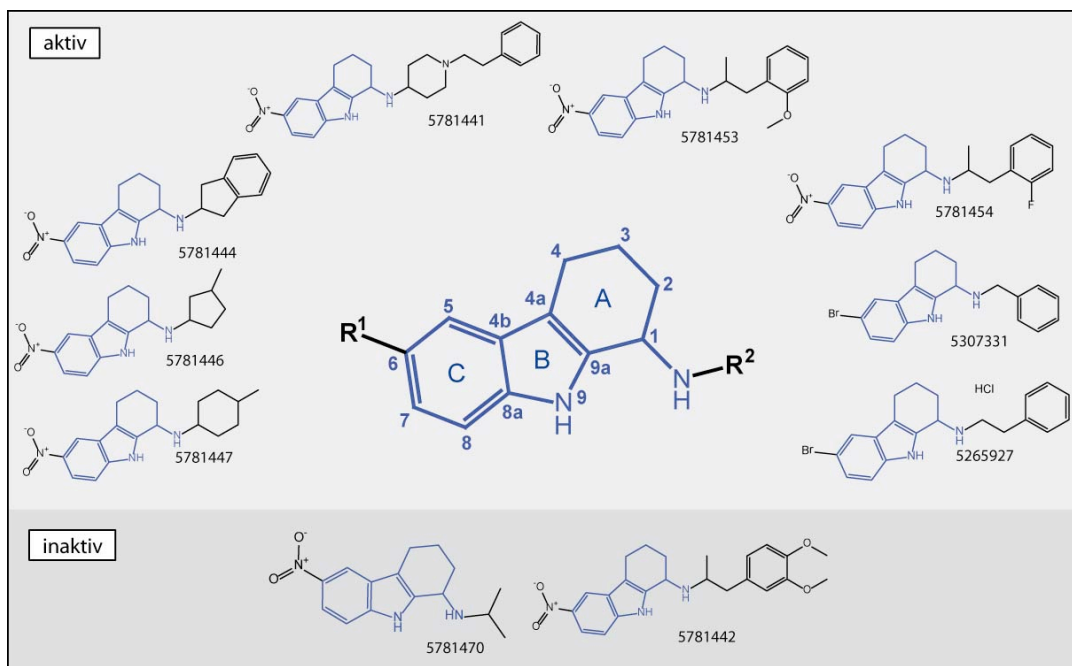


Abb. 30: Carbazole aus der DIVERSet-Substanzbibliothek

Gezeigt sind die in der Substanzbibliothek DIVERSet enthaltenen Tetrahydrocarbazolamine. Dieser Cluster wurde mit Hilfe des Datamining identifiziert. Mittig ist die Leitstruktur angegeben, der sämtliche untersuchten Tetrahydrocarbazole folgen. R^1 und R^2 stellen dabei variable Reste dar.

Eine erste Struktursuche bezüglich der Patentierbarkeit von Tetrahydrocarbazolaminen verlief positiv, daher wurde diese Strukturklasse für die weiteren Untersuchungen herangezogen. Für die Analyse von Struktur-Aktivitäts-Beziehungen war es notwendig weitere Analoga der Leitstruktur zu testen. Daher wurden bei ChemBridge kommerziell verfügbare Tetrahydrocarbazole (komplette Liste siehe Kapitel 8.1, Seite 141f) erworben. Um zusätzlich den Effekt von spezifischen Substituenten zu untersuchen, wurden weitere Tetrahydrocarbazole (komplette Liste siehe Kapitel 8.2, Seite 146f) durch André Gehring im Arbeitskreis von Prof. Dr. Franz Bracher synthetisiert (120). Aus diesem Projekt gingen mehrere Wirkstoffkandidaten als äußerst vielversprechende Ver-

treter der Strukturklasse hervor. Diese Vertreter wurden im Rahmen einer Erfindungsmeldung bei der Ludwig-Maximilians-Universität und der Bayerischen Patentallianz (BayPat) für eine mögliche Patentierung eingereicht. Die daraufhin von der BayPat durchgeführte Recherche bezüglich der Patentierbarkeit besagte, dass die identifizierte Strukturklasse der Tetrahydrocarbazolamine neu und die Identifizierung erfinderisch ist. Anschließend wurde aus diesen Strukturen zusammen mit den in den folgenden Kapiteln dargestellten Ergebnissen eine Patentanmeldung erstellt und beim Europäischen Patentamt eingereicht (153).

Die stärksten Effekte wurden mit Analoga der identifizierten Leitstruktur (Abb. 30, Seite 74) mit spezifischen Resten an C-6 (R^1) und an der exozyklischen Aminogruppe (R^2) erzielt. Für R^1 konnte vor allem für elektronenziehende Substituenten wie Halogene, Nitro, Trifluormethyl und Cyano ein steigender Effekt auf die Aktivität in den zellulären Assays für Kalzium, Mitochondrien und Abeta festgestellt werden. Eine Substitution an C-7 oder C-8 (vgl. *gea_84* in Abb. 46, Seite 148) hingegen verringerte ebenso wie die Vergrößerung des Ring A zum Siebenring (vgl. *gea_139* in Abb. 46, Seite 148) die Aktivität. Auch eine *N*-Methylierung des Pyrrol-Stickstoffes (N-9; vgl. *gea_90* in Abb. 46, Seite 148f) oder der exozyklischen Aminogruppe an C-1 (vgl. *gea_92* in Abb. 46, Seite 148) verminderte die Aktivität. Rein aliphatische Reste für R^2 (vgl. 5781439, 5781448, 5781457 in Abb. 45, Seite 145 und *gea_87* in Abb. 46, Seite 148) verringerten ebenfalls die Aktivität, während die zusätzliche Bindung von aromatischen Gruppen, wie zum Beispiel eines Phenyl-Restes, an diese Reste wiederum die Aktivität in allen getesteten Assays erhöhte (vgl. 5781441, 5781464 in Abb. 45, Seite 145). Die stärkste Aktivität in allen Assays wurde mit Tetrahydrocarbazolen erreicht, die in R^2 eine Diamino-Seitenkette (Aminopiperidin), welche mit einem *N*-Benzyl- oder *N*-Phenethylrest substituiert ist, besitzen (vgl. 5781441, 5781464 in Abb. 45, Seite 145 und *gea_96*, *gea_97*, *gea_101*, *gea_102*, *gea_130* und *gea_133* in Abb. 46, Seite 148). Somit konnte durch systematische Optimierung der Leitstruktur eine Unterklasse an Molekülen entwickelt werden, die in allen 3 Assays hochaktiv ist. Die prominentesten Vertreter dieser Unterklasse wurden weiter analysiert und sind in Abb. 31 auf Seite 76 dargestellt.

3.2 Dosis-Wirkungs-Beziehungen

Die Bestimmung von Dosis-Wirkungs-Beziehungen chemischer Substanzen beschreibt den Zusammenhang zwischen der Dosis einer Substanz und seiner Wirkung. Aus den damit erstellten Dosis-Wirkungskurven kann man dann die Potenz, den Maximaleffekt und das Spektrum zwischen minimal messbarer Wirkung und Maximalwirkung ablesen. Werden mehrere Substanzen in einem Graphen aufgetragen, lassen sich diese Parameter direkt miteinander vergleichen.

Die Wirkung der getesteten Substanzen auf die Freisetzung von Kalzium aus dem ER, die Erhöhung des mitochondrialen Membranpotentials und die Verringerung der A β -Peptid Spiegel konnte von Honarnejad et al. bei einer fixen Konzentration von 10 μ M beschrieben werden (120). In der hier vorliegenden Arbeit sollten nun die Dosis-Wirkungs-Beziehung der wichtigsten Substanzen untersucht werden. Die Auswahl dieser Substanzen (vgl. Abb. 31, Seite 76) orientierte sich neben ihrer Aktivität auch daran, für welche der bestmögliche Patentschutz zu erlangen ist.

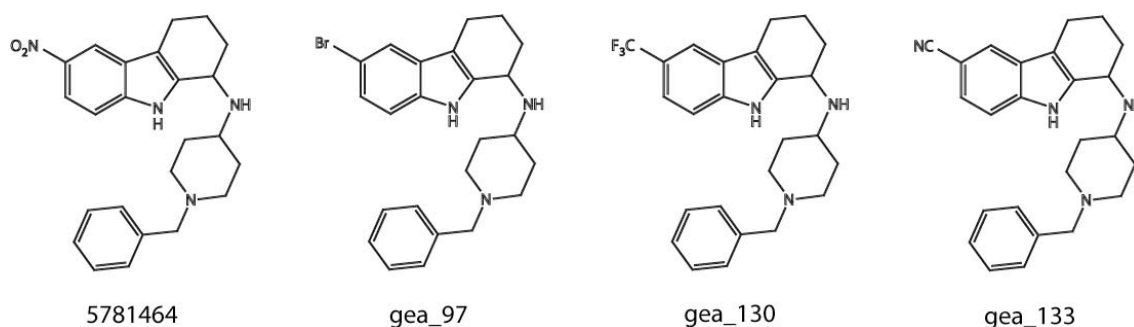


Abb. 31: Die 4 weiter analysierten Vertreter der Tetrahydrocarbazolamine

Zu sehen sind die prominentesten Vertreter aus der Klasse der Tetrahydrocarbazolamine. Verbindung 5781464 aus der kommerziellen Substanzbibliothek diente hierbei als Referenz.

3.2.1 Modulation der Freisetzung von Kalzium aus dem ER

Die Modulation der gestörten Kalziumhomöostase gewinnt als mögliche Therapie des Morbus Alzheimer immer mehr an Beachtung. Wir haben die Freisetzung von Kalzium aus dem ER analysiert und damit die Wirkung von Tetrahydrocarbazolaminen auf einen bestimmten Aspekt der zellulären Kalziumhomöostase bei 6 verschiedenen Konzentrationen getestet. Als Output diente hierfür die Peak-Amplitude der durch Carbachol hervorgerufenen Freisetzung von Kalzium aus dem ER. Diese Peak-Amplitude wurde ge-

gen Kontrollbedingungen (DMSO) normalisiert. Verwendet wurden HEK-Zellen, die neben der krankheitsverursachenden PS1-Mutation (M146L) auch den Kalziumindikator YC3.6 stabil exprimieren. In Abb. 32A, auf Seite 77 sind die jeweiligen normalisierten Kalziumsignale der getesteten Moleküle sowie der Kontrollsubstanzen angegeben.

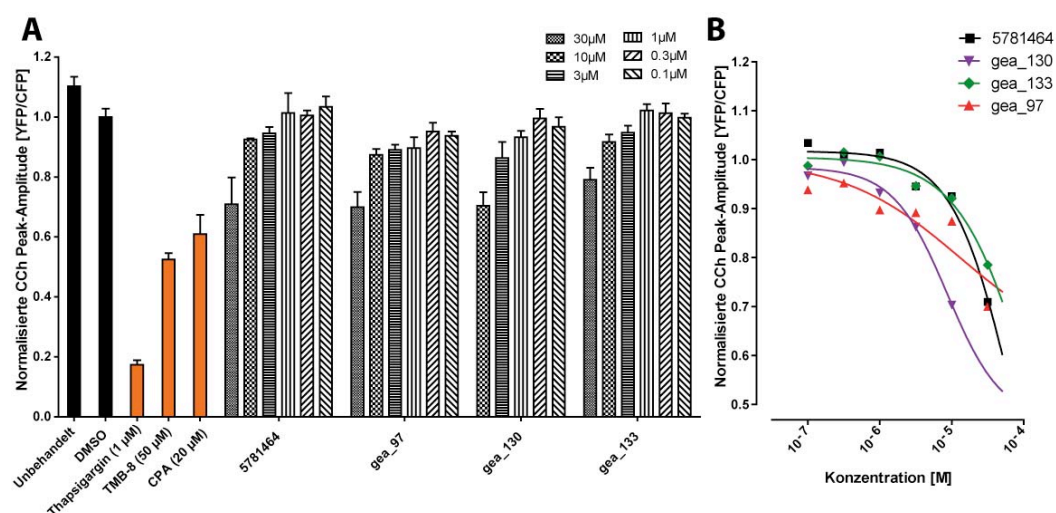


Abb. 32: Effekt von Tetrahydrocarbazolaminen auf den Ausstrom von Kalzium aus dem ER

Es wurde die durch Carbachol hervorgerufene Freisetzung von Kalzium aus dem ER unter Behandlung mit Testsubstanzen bestimmt. Verwendet wurden HEK-Zellen, die neben dem Kalziumindikator YC3.6 auch die PS1-Mutation M146L exprimieren. Dargestellt sind die auf die DMSO Lösungsmittelkontrolle normalisierten Peakamplituden der Freisetzung von Kalzium aus dem ER.

A: Säulendiagramm mit Peak-Amplituden **B:** Dosis-Wirkungskurven

Der IC_{50} -Wert gibt an, bei welcher Substanzkonzentration der beobachtete Effekt auf die Hälfte abgesunken ist und ist damit gut für eine Charakterisierung eines Liganden im Vergleich zu anderen Strukturen geeignet. Um die IC_{50} -Werte der einzelnen Substanzen zu berechnen wurden die Ergebnisse zusätzlich in Form eines XY-Diagramms dargestellt und eine Dosis-Wirkungskurve erstellt (Abb. 32B, Seite 77). Bei der Testung von Konzentrationen über 30 μ M zeigten die Zellen erste Anzeichen einer toxischen Schädigung. Unter diesen Bedingungen ist das Ergebnis der Kalziummessung nicht mehr auswertbar. Mit den hier getesteten Wirkstoffkonzentrationen war es daher nicht möglich eine maximale Inhibition der Freisetzung von Kalzium aus dem ER zu erreichen. Für die Berechnung von IC_{50} -Werten ist dieser Wert jedoch notwendig. Unabhängig davon sind Tetrahydrocarbazolamine in der Lage den Kalziumausstrom aus dem ER

dosisabhängig zu vermindern. Es ist erwähnenswert, dass es nicht in unserem Interesse lag, die Freisetzung von Kalzium aus dem ER maximal zu reduzieren. Eine Reduktion des Kalziumspiegels unter physiologische Spiegel könnte zu toxischen Effekten führen. Der Kalziumspiegel sollte daher lediglich auf 80-95% des Kontrollwertes (DMSO) abgesenkt werden.

3.2.2 Modulation des mitochondrialen Membranpotentials

Störungen der mitochondrialen Funktion sind mit der Pathogenese neurodegenerativer Erkrankungen wie dem Morbus Alzheimer assoziiert (154). Die Wirkung der Tetrahydrocarbazolamine auf die Modulation des mitochondrialen Membranpotentials wurde bei 6 verschiedenen Konzentrationen getestet (vgl. Abb. 33, Seite 78). TMRM ist ein Farbstoff, der sich auf Grund seiner positiven Ladung in intakten Mitochondrien anreichert. Das mitochondriale Membranpotential korreliert dabei direkt mit den messbaren relativen Lichteinheiten (RLU). Die gemessenen Daten wurden gegen die Lösungsmittelkontrolle (DMSO) normalisiert.

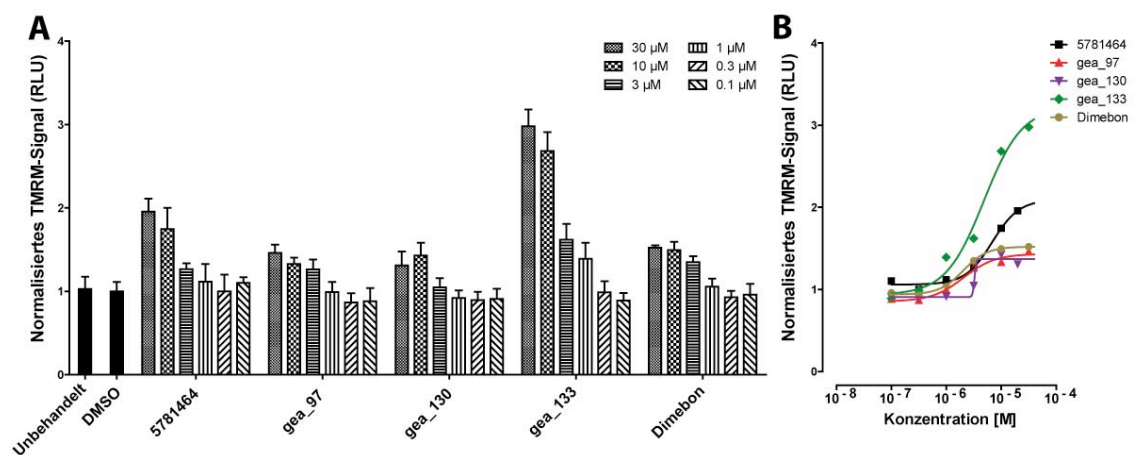


Abb. 33: Effekt von Tetrahydrocarbazolaminen auf das mitochondriale Membranpotential

Das TMRM-Signal (RLU) der Testsubstanzen wurde bei 6 verschiedenen Konzentrationen (30 μ M, 10 μ M, 3 μ M, 1 μ M, 0,3 μ M und 0,1 μ M) in WT-HEK-Zellen bestimmt. Dargestellt sind die auf DMSO normalisierten relativen Lichteinheiten von TMRM.

A: Säulendiagramm mit TMRM-Signalen **B:** Dosis-Wirkungskurven

In Abb. 33A, Seite 78 sind die gemessenen, normalisierten relativen Lichteinheiten nach Inkubation mit den getesteten Tetrahydrocarbazolamine und von Dimebon gezeigt. Dimebon (Latrepirdin) ist ein vor allem in Russland verwendetes Antihistaminikum, von dem 2010 aus in Russland durchgeführten klinischen Studien bekannt wurde, dass es einen positiven Effekt bei Alzheimerpatienten haben soll (155). Diese Effekte von Dimebon wurden seiner Wirkung auf die Funktion von Mitochondrien zugeschrieben (156). Für eine Charakterisierung der hier verwendeten Tetrahydrocarbazolamine auf die Funktion von Mitochondrien wurde Dimebon deshalb als Positivkontrolle verwendet. Abb. 33B, Seite 78 zeigt die dazugehörigen Dosis-Wirkungskurven. Die daraus berechneten EC_{50} -Werte sind in Tab. 4, Seite 79 aufgelistet.

	5781464	gea_97	gea_130	gea_133	Dimebon
EC_{50} [μ M]	6,85	2,05	3,26	4,83	2,03
R^2	0,827	0,806	0,519	0,941	0,896
Maximum	2,094	1,433	1,371	3,225	1,520

Tab. 4: Mittlere effektive Konzentrationen (EC_{50}) der Tetrahydrocarbazolamine auf das mitochondriale Membranpotential

R^2 ist das Bestimmtheitsmaß und gibt somit die Qualität für die Anpassung der Dosis-Wirkungskurve an. **Maximum** bezeichnet den maximalen Effekt im Vergleich zur Lösungsmittelkontrolle (DMSO), den ein Wirkstoff auf das mitochondriale Membranpotential ausüben kann.

Die EC_{50} -Werte aller getesteten Substanzen befinden sich im niederen mikromolaren Bereich und liegen damit im Arzneimittelniveau. Die Substanz gea_133 ist in der Lage das mitochondriale Membranpotential um den Faktor 3 im Vergleich zu Kontrollbedingungen (DMSO) anzuheben. Die Substanz gea_133 zeigt eine 2-fach höhere Wirkstärke als Dimebon und stellt den potentesten Vertreter der Tetrahydrocarbazolamine dar.

3.2.3 Modulation von A β -Peptid Spiegeln

A β -Peptide sind der zentrale Baustein von Plaques im Gehirn von Alzheimer-Patienten. Die Verminderung ihrer Spiegel ist daher ein wichtiges Ziel in der Wirkstoffforschung für die Therapie des Morbus Alzheimer. Der Effekt von Tetrahydrocarbazolaminen auf die Senkung dieser Spiegel wurde bei 6 verschiedenen Konzentrationen getestet (vgl. Abb. 34, Seite 80). Hierfür wurden die Spiegel von A β -Peptiden unterschiedlicher Länge (38, 40 und 42 Aminosäuren) mit Hilfe der Sandwich-ELISA Technik gemessen und gegen Kontrollbedingungen (DMSO) normalisiert. Verwendet wurde das Medium von HEK-Zellen mit PS1(M146L)- und APPswe-Mutation. In Abb. 34, Seite 80 sind die normalisierten Spiegel der Abeta-Peptide 38 (A), 40 (B), und 42 (C) unter der Behandlung mit den genannten Tetrahydrocarbazolaminen dargestellt. Alle hier untersuchten Substanzen sind in der Lage die Spiegel von A β -Peptiden unabhängig von deren Länge um mindestens 50 Prozent zu senken.

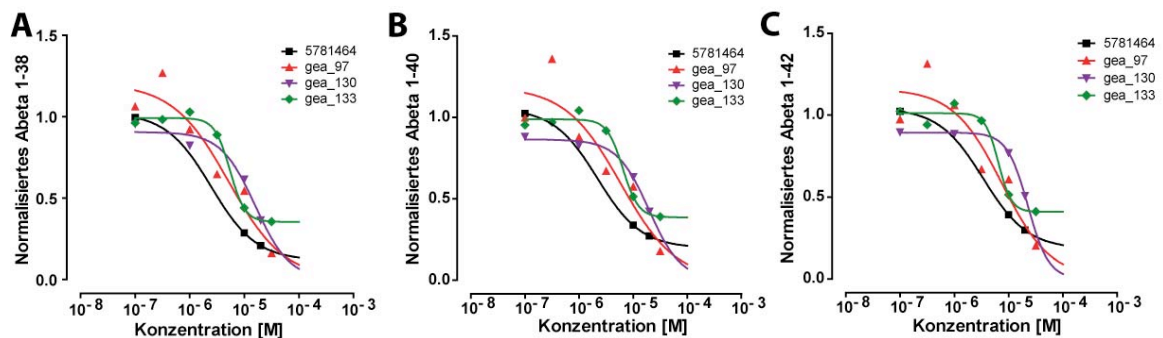


Abb. 34: Effekt von Tetrahydrocarbazolaminen auf die Spiegel unterschiedlich langer A β -Peptide

Es wurden A β -Peptid Spiegel unter Behandlung mit Testsubstanzen bei 6 verschiedenen Konzentrationen (30 μ M, 10 μ M, 3 μ M, 1 μ M, 0,3 μ M und 0,1 μ M) bestimmt. Verwendet wurde Medium, das von HEK-Zellen mit PS1 und APP-Mutation konditioniert wurde. Dargestellt sind die auf DMSO normalisierten Dosis-Wirkungskurven für A β 38 (A), A β 40 (B) und A β 42 (C).

Für die Berechnung der IC₅₀-Werte von Tetrahydrocarbazolaminen auf die Spiegel der A β -Peptide wurde eine nichtlineare Kurve durch die Messwerte gelegt (vgl. Abb. 34, Seite 80). Die berechneten IC₅₀-Werte liegen im mikromolaren Bereich und somit im Arzneimittelniveau (siehe Tab. 5, Seite 81).

		5781464	gea_97	gea_130	gea_133
A β 38	IC ₅₀ [μ M]	5,61	5,29	4,79	5,26
	R ²	0,989	0,920	0,923	0,973
A β 40	IC ₅₀ [μ M]	5,66	5,23	4,71	5,19
	R ²	0,966	0,837	0,949	0,921
A β 42	IC ₅₀ [μ M]	5,46	5,11	4,64	5,18
	R ²	0,961	0,862	0,940	0,900

Tab. 5: Mittlere inhibitorische Konzentrationen (IC₅₀) auf die Spiegel von A β -Peptiden unter Inkubation mit Tetrahydrocarbazolaminen

R² ist das Bestimmtheitsmaß und gibt somit die Qualität für die Anpassung der Dosis-Wirkungskurve an.

Als Ursache einer Verminderung in A β -Peptid Spiegeln kommen im Wesentlichen eine Inhibierung oder Modulation der β - oder γ -Sekretasen in Frage. Anders als die γ -Sekretase-Inhibitoren reduzieren γ -Sekretase-Modulatoren nicht direkt die Konzentration von A β -Peptiden, sondern verschieben das Verhältnis von A β 42/40 in Richtung der weniger toxischen, kürzeren Spezies. Um die Tetrahydrocarbazolamine dahingehend zu charakterisieren, wurde das Verhältnis von A β 42/40 berechnet (vgl. Abb. 35, Seite 82).

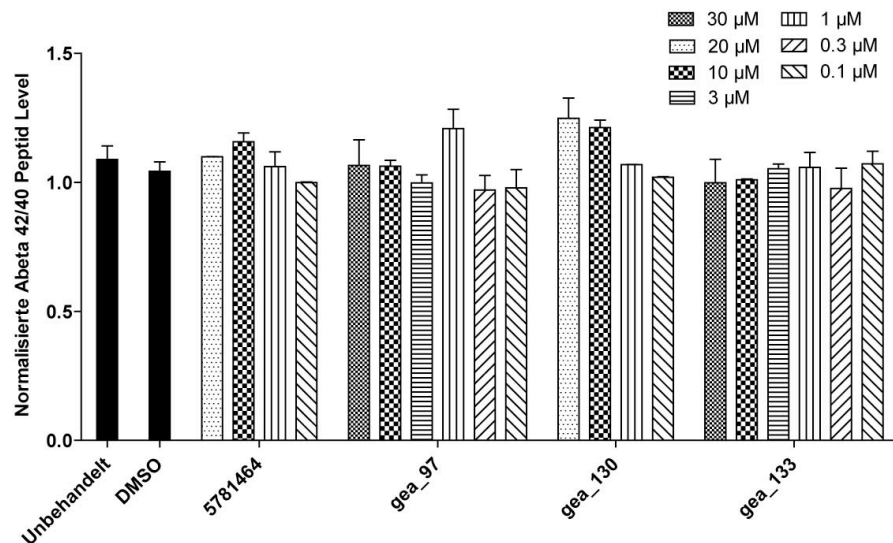


Abb. 35: Effekt von Tetrahydrocarbazolaminen auf das Verhältnis von Aβ42/40

Es wurde das Verhältnis der Aβ42/40 Spiegel unter Inkubation mit den wichtigsten Vertretern der identifizierten Leitstruktur bei 6 verschiedenen Konzentrationen bestimmt. Verwendet wurde Medium, das von HEK-Zellen mit PS1 und APP-Mutation konditioniert wurde. Dargestellt sind die auf DMSO normalisierten Verhältnisse von Aβ42/40.

Die Verhältnisse der unterschiedlich langen Aβ-Peptide ergab keine signifikante Veränderung unter Inkubation mit Tetrahydrocarbazolaminen. Die getesteten Substanzen verhalten sich somit nicht wie ein γ-Sekretase-Modulator. Hier wäre das Verhältnis von Aβ42/40 erniedrigt gewesen.

Eine weitere Möglichkeit ist, dass Tetrahydrocarbazolamine einen direkten Effekt auf die Aktivität der γ-Sekretase ausüben. Ein geeignetes Modellsystem um den isolierten Effekt von Substanzen auf die γ-Sekretase zu untersuchen ist die Messung der Aβ-Peptid Spiegel von Zellen, die das C-terminale Fragment C99 überexprimieren (120). C99 entsteht nach Spaltung von APP durch β-Sekretase. Die Bildung von Aβ-Peptiden ist daher nur noch von der γ-Sekretase abhängig. Mit den getesteten Tetrahydrocarbazolaminen konnte keine Veränderung der Konzentration von Aβ-Peptiden im Vergleich zu Kontrollzellen gemessen werden, weshalb ein direkter Effekt dieser Substanzklasse auf die Aktivität der γ-Sekretase somit ausgeschlossen ist (120).

Die zweite wichtige Sekretase, die an der Bildung von Aβ-Peptiden beteiligt ist, ist die β-Sekretase (BACE1). Die Spaltung durch BACE1 ist als initialer Schritt der amyloiden Prozessierung für die Produktion der Aβ-Peptide zwingend notwendig. Ein geeignetes Modellsystem um zu untersuchen, ob die getesteten Tetrahydrocarbazolamine

einen Effekt auf die α - oder β -Sekretase besitzen, ist die Messung der Spiegel der primären Spaltprodukte APPs α und APPs β . Die Behandlung von Zellen mit Tetrahydrocarbazolaminen veränderte jedoch die Spiegel von APPs α nicht. Eine Wirkung von Tetrahydrocarbazolaminen auf die α -Sekretase ist daher im Wesentlichen ausgeschlossen (120). Für die Spiegel von APPs β konnten wir jedoch eine deutliche Senkung nach Behandlung mit Tetrahydrocarbazolaminen messen. Tetrahydrocarbazolamine sind somit in der Lage die Aktivität der β -Sekretase signifikant zu vermindern (120). Dieses ist wahrscheinlich bedingt durch den Effekt der Tetrahydrocarbazolamine auf die zelluläre Kalziumhomöostase. So konnte Hayley et al. zeigen, dass die Aktivität von BACE1 unter physiologischen Bedingungen durch die Kalziumkonzentration im Zytosol beeinflusst wird (157). Der genaue Wirkmechanismus der Tetrahydrocarbazolamine ist noch nicht entschlüsselt, jedoch ist davon auszugehen, dass die Stabilisierung der Kalziumhomöostase sowohl das mitochondriale Membranpotential, als auch die Aktivität von BACE1 und damit die A β -Peptid Synthese beeinflusst.

3.3 Akute Toxizität und pharmakokinetische Eigenschaften

3.3.1 Einfluss auf die Glutamattoxizität

Glutamat ist der wichtigste exzitatorische Neurotransmitter im Gehirn. Ein Überschuss führt jedoch zu einem massiven Einstrom von Kalzium in Nervenzellen, was letztendlich zum Absterben der entsprechenden Neurone (Exzitotoxizität) führt. Mutationen in den Präsenilin-Genen, die die häufigste Ursache familiärer Alzheimer-Erkrankungen sind, führen neben einer erhöhten A β -Peptid-Bildung zu einer Beeinflussung der zellulären Kalziumhomöostase. So kommt es bei Gabe von Glutamat im Vergleich zu Wildtyp-Präsenilin zu einer erhöhten Ausschüttung von Kalzium aus intrazellulären Speichern und damit einer verstärkten Exzitotoxizität (62). Kainat-Rezeptoren sind Subtypen der ionotropen Glutamatrezeptoren, die nach ihrem spezifischen Agonisten Kainsäure benannt sind (147). Kainsäure wirkt stark exzitatorisch und führt zu einer Degeneration von Nervenzellen (Exzitotoxizität). Präsenilinmutationen senken die Schwelle der exzitatorisch-toxischen Konzentration von Kainsäure. Dantrolen verhindert die Freisetzung von Kalzium aus dem endoplasmatischen Retikulum und ist in der Lage diese Schwelle auf physiologische Spiegel anzuheben (62). Da die hier untersuchten Tetrahydrocarbazolamine ebenfalls in der Lage sind die Freisetzung von Kalzium aus dem ER zu verringern (siehe Kapitel 3.2.1, Seite 76), wurde untersucht ob diese die kalziumvermittelten zytotoxischen Eigenschaften einer erhöhten Glutamatkonzentration verringern können.

Hierfür wurden embryonale hippocampale Kulturen von PS1-(A246E)-Mäusen mit *gea_133* und verschiedenen Glutamatkonzentrationen inkubiert. Anschließend wurde das Überleben der behandelten Zellen mit Hilfe des MTT-Tests gemessen. Die Anzahl von gesunden Zellen korreliert hierbei direkt mit der messbaren relativen Lichtintensität. Die Toxizität von Glutamat ist abhängig von der extrazellulären Kalziumkonzentration. Bei einer Kalziumkonzentration von 300 μ M im Zellkulturmedium konnte keine messbare Zelltoxizität bei Zugabe von Glutamat in unterschiedlichen Konzentrationen (Abb. 36A, Seite 85) festgestellt werden. Bei höheren Kalziumkonzentrationen (3mM) im Medium gelang es eine konzentrationsabhängige Toxizität von Glutamat zu beobachten. Die Behandlung mit *gea_133* konnte die Glutamattoleranz der Zellen jedoch nicht verbessern (Abb. 36B, Seite 85).

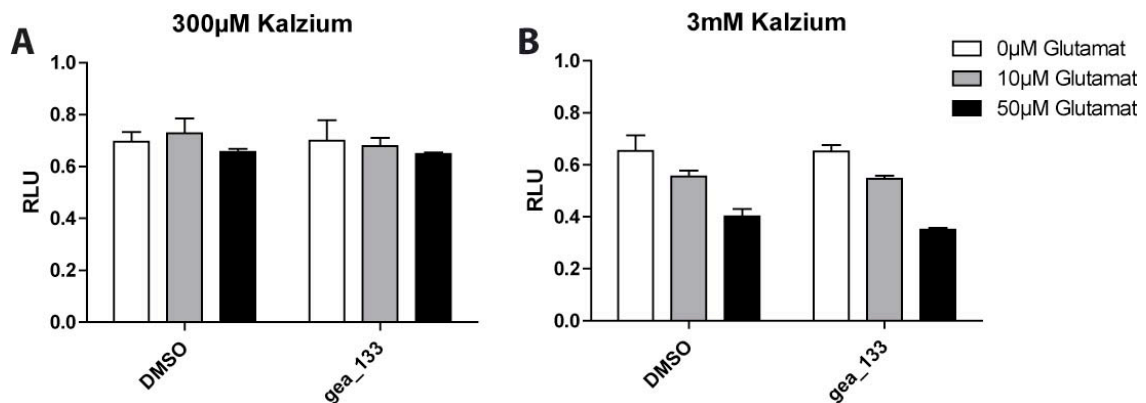


Abb. 36: Glutamattoxizität in primären Nervenzellkulturen von PS1(A246E)-Mäusen

Glutamattoxizität in hippocampaler Primärzellkultur (11 DIV) von FAD-Mäusen (A246E) unter Behandlung mit gea_133. Auf der Ordinate ist die Zellviabilität in relativen Lichteinheiten (RLU) aus dem MTT-Test angegeben.

A: 300 µM Kalzium im Zellkulturmedium. **B:** 3 mM Kalzium im Zellkulturmedium.

3.3.2 Bestimmung der LD₅₀

Bei der Bestimmung der pharmakologischen Eigenschaften eines bisher unbekannten Stoffes, ist die Toxizität im Tier von zentraler Bedeutung. In der vorliegenden Arbeit wurde die letale Dosis von Tetrahydrocarbazolaminen in Mäusen getestet, da der Therapieversuch ebenfalls in dieser Tierart durchgeführt werden sollte. Die letale Dosis (LD) ist jene Dosis eines Stoffes, die für ein bestimmtes Lebewesen tödlich wirkt. Ein gebräuchlicher Wert ist die LD₅₀ (mittlere letale Dosis), welche die Konzentration angibt, bei der die Hälfte aller Versuchstiere einer Spezies stirbt. Somit ist sie ein wichtiger Parameter für die spätere Dosisfindung. Die LD₅₀ wurde anhand des OECD Test 423 (Acute Oral Toxicity – Acute Toxic Class Method) bestimmt (133).

Für die Tetrahydrocarbazolamine gea_97 und gea_133 konnte keine akute Toxizität in Mäusen bei einer Konzentration von 300 mg/kg Körpergewicht festgestellt werden. Der Versuch mit dieser Dosis wurde laut dem Schema in Abb. 16 auf Seite 50 noch ein weiteres Mal durchgeführt. Dieser bestätigte das vorherige Ergebnis. Eine Verweigerung der Nahrungsaufnahme ist eines der ersten Anzeichen von Toxizität und macht sich unmittelbar am Körpergewicht der Versuchstiere bemerkbar. Daher wurde zusätzlich das Körpergewicht der behandelten Tiere über 2 Wochen nach Verabreichung (Tag 0) gemessen (vgl. Abb. 37, Seite 86). Das Körpergewicht der Versuchstiere veränderte sich bei einer Dosis von 300 mg/kg Körpergewicht nicht. Die getesteten Tetrahydro-

carbazolamine werden bei dieser Dosis gut vertragen. Die nächst höher verabreichte Konzentration von gea_97 und gea_133 (2000 mg/kg Körpergewicht) führte jedoch innerhalb weniger Tage zum Tod aller Versuchstiere. Anhand des Schemas in Abb. 16, auf Seite 50, ergibt sich somit die GHS (*Globally Harmonized Classification System*) Kategorie 4 (>300-2000mg/kg Körpergewicht). Da bei 2000 mg/kg Körpergewicht drei Versuchstiere gestorben sind, lässt sich eine LD₅₀ von 500 mg/kg Körpergewicht bestimmen. Für einen besseren Vergleich, beziehungsweise eine Einordnung in LD₅₀-Werte bekannter und zugelassener Arzneimittel, wurde der gut verträgliche Wirkstoff Paracetamol herangezogen. Paracetamol weist in dieser Tierart eine LD₅₀ von 338 mg/kg Körpergewicht auf (158). Für die untersuchten Tetrahydrocarbazolamine ergibt sich somit eine niedrigere Toxizität als für Paracetamol.

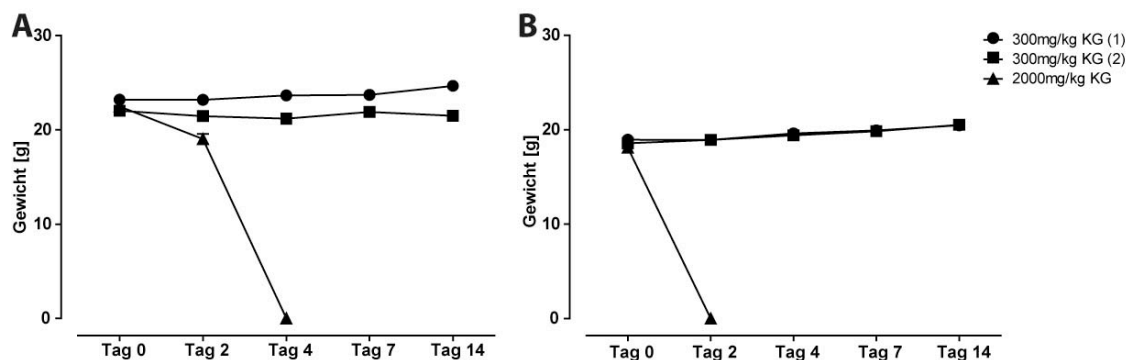


Abb. 37: Körpergewicht von C57/Bl6 Mäusen während der Toxizitätsstudie

Gezeigt ist das Gewicht von je 3 weiblichen, 8 Wochen alten C57/Bl6 Mäusen, die mit gea_133 (A) oder gea_97 (B) per Magensonde in der angegebenen Konzentration behandelt wurden.

3.3.3 Versuche zur Frage der Wirkstoffapplikation

Die Erforschung von Wirkstoffen für die Therapie von chronisch progressiven Erkrankungen, wie dem Morbus Alzheimer, macht die Untersuchung einer Langzeitverabreichung im Tiermodell erforderlich. Aus diesem Grund wurde nach möglichst gut verträglichen Verabreichungsformen für den Therapieversuch gesucht. Gleichzeitig musste sichergestellt werden, dass der Wirkstoff auch in adäquater Weise resorbiert wird. Im Wesentlichen stehen zwei unterschiedliche Applikationswege zur Verfügung: die enterale und die parenterale Applikation.

Die enterale Verabreichung kann entweder über eine Magensonde oder über die Nahrung beziehungsweise Trinkwasser erfolgen. Mit Ausnahme der Magensonde liegen die Vorteile dieser Applikationsart vor allem in der geringen Belastung der Tiere, was insbesondere bei langen Therapiezeiträumen relevant ist. Als nachteilig ist dagegen anzusehen, dass der Wirkstoff zunächst im Gastrointestinaltrakt (GIT) resorbiert werden muss und Geschmack bzw. Geruch der zu verabreichenden Substanz zu Schwierigkeiten führen können. Die parenterale Verabreichung umgeht den Gastrointestinaltrakt. Hier sind im Wesentlichen folgende Verabreichungsformen zu nennen: die intravenöse (i.v.), intramuskuläre (i.m.), intraperitoneale (i.p.) und subkutane (s.c.) Injektion.

Die Versuche wurden ausschließlich mit *gea_133* durchgeführt, da diese Verbindung einerseits zu den potentesten Vertretern der Tetrahydrocarbazolamine zählt, und andererseits ein patentrechtlicher Stoffschutz für diese Verbindung möglich ist. Ziel war es eine Applikationsart zu identifizieren, bei der *gea_133* den Mäusen über einen Zeitraum von mehreren Monaten verabreicht werden kann. Auf Grund der Tatsache, dass die Resorption normalerweise eine lineare Dosisabhängigkeit aufweist, wurden die folgenden Versuche bei einer einzigen Dosis von 100 mg/kg Körpergewicht an weiblichen C57/Bl6 Mäusen durchgeführt.

Die enterale Verabreichung mit Hilfe von Erdnussbutter stellt eine sehr schonende Art der Wirkstoffapplikation dar. Obwohl die Mäuse an die zusätzliche Gabe mit Erdnussbutter gewöhnt wurden, verweigerten sie die Aufnahme von Erdnussbutter, in welche die Substanz *gea_133* eingearbeitet worden war. Möglicherweise besitzt *gea_133* einen für die Mäuse erkennbaren Eigengeruch bzw. Geschmack. Unangenehme Gerüche von Substanzen können in der Regel mit Aromastoffen überdeckt werden. Daher wurde als nächstes untersucht, ob Mäuse eine mit Phenethylacetat (Apfelaroma) aromatisierte Erdnussbutter zu sich nehmen. Zunächst wurde das Aroma in die Erdnussbutter eingearbeitet und diese anschließend mit *gea_133* bzw. DMSO versetzt. Erneut wurden die Tiere an die Verabreichung der nun aromatisierten Erdnussbutter gewöhnt. Bei der Verfütterung der mit *gea_133* versetzten aromatisierten Erdnussbutter erkannten die Versuchstiere diese jedoch und verweigerten die Aufnahme. Ein Eigengeruch des Moleküls kann also mit relativ großer Sicherheit ausgeschlossen werden, da auch die Aromatisierung mit Phenethylacetat das Fressverhalten der Tiere nicht ändern konnte.

Als nächstes sollte untersucht werden, ob der Geschmack von *gea_133* ursächlich für die Aufnahmeverweigerung der Tiere ist. Die Überdeckung von Geschmäckern ge-

schieht normalerweise durch die Zugabe von anderen Geschmacksstoffen. Zusätzlich wurde für diesen Versuch eine andere Matrix (Gelatinelösung) gewählt. Diese hat den Vorteil, dass sich der lipophile Wirkstoff leichter aus der Matrix herauslöst und somit eine bessere Aufnahme gewährleistet ist. In diesem Versuch wurde gea_133, beziehungsweise DMSO, in Dr. Oetkers Götterspeise mit Himbeergeschmack eingearbeitet. Nach Gewöhnung an die neue Matrix wurde den Tieren die mit Wirkstoff versetzte Gelatine verfüttert. Auch hier verweigerten die Mäuse die Aufnahme. Ein unangenehmer Geschmack des Moleküls ist eher unwahrscheinlich, da das Versetzen der Gelatine mit Himbeergeschmack das Fressverhalten der Tiere nicht ändern konnte. Es besteht jedoch auch die Möglichkeit, dass das Himbeeraroma einen unangenehmen Geschmack von gea_133 nicht ausreichend maskieren konnte.

Eine mögliche Erklärung für das Fressverhalten der Tiere ist, dass gea_133 eventuell zu lokalen Reizungen im Mundraum oder Gastrointestinaltrakt der Versuchstiere führt. Somit war eine Verabreichung von gea_133 mit der Nahrung mit den uns zur Verfügung stehenden Mitteln nicht möglich. Eine weitere Möglichkeit der enteralen Verabreichung von Wirkstoffen ist per Magensonde. Die tägliche Applikation per Magensonde muss unter Narkose verlaufen und bedeutet daher einen enormen Stress für die Tiere. Diese Methode ist nur über einen kurzen Zeitraum anwendbar und deswegen für unser Vorhaben nicht geeignet.

Bei der Suche nach alternativen Methoden der Wirkstoffapplikation stand nun der parenterale Weg im Vordergrund. Die regelmäßige Injektion von Wirkstoffen übt jedoch ebenfalls einen gewissen Stress auf die behandelten Tiere aus. Deshalb wurde zunächst eine schonende und gleichmäßige Wirkstoffapplikation mittels kleiner implantierbarer Wirkstoffpumpen untersucht. Die osmotischen Minipumpensysteme der Firma Alzet[®] besitzen eine konstante Abgaberate und sind hierfür sehr gut geeignet. Die verschiedenen Pumpen unterscheiden sich im Wesentlichen durch ihre Förderrate und damit dem Zeitraum, über den sie einen Wirkstoff an das Versuchstier abgeben können. Wie bereits beschreiben, sollte die Therapie mit gea_133 idealerweise über einen Zeitraum von 3 Monaten erfolgen, weshalb das Modell 2006 ausgewählt wurde. Diese Pumpe verbleibt über einen Zeitraum von bis zu 6 Wochen in der Maus, ein Wechsel ist somit nur einmal während der Therapie notwendig. Dies reduziert den Stress auf die Versuchstiere auf ein Minimum. Vor Beginn des Langzeitexperimentes sollten zunächst die Wirkstoffspiegel in Blut und Gehirn nach Implantation der Pumpe untersucht werden.

Bei der Dauerinfusion durch die Pumpen steigt zunächst die Konzentration im Plasma an. Gleichzeitig wird die Eliminationsgeschwindigkeit größer, bis sich ein Gleichgewichtszustand (*steady state*) bildet. Dieses Gleichgewicht stellt sich normalerweise nach circa 5 Halbwertszeiten des Wirkstoffes ein (147). Die Halbwertszeit von gea_133 im Blut bei subkutaner Verabreichung beträgt circa 14 Stunden (vgl. Abb. 39A, Seite 91), der *steady state* müsste demnach innerhalb von 70 Stunden erreicht sein. Um sicherzugehen, dass die Bestimmung der Wirkstoffspiegel in diesem Gleichgewicht stattfindet, wurden zusätzlich 2 Tage als Reserve hinzugerechnet und die Spiegel somit 5 Tage nach Implantation der Pumpe bestimmt. Bei der Explantation der Pumpe konnte eine deutliche Verklumpung an der Öffnung der Pumpen festgestellt werden (vgl. Abb. 38A, Seite 89). Des Weiteren konnte gea_133 nicht im Blut oder Gehirn der Versuchstiere nachgewiesen werden. Vermutlich führte die Verklumpung an der Öffnung der Pumpe zu einer nicht ordnungsgemäßen Wirkstoffabgabe.

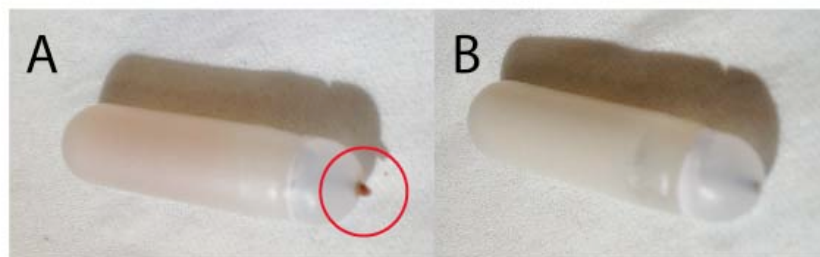


Abb. 38: ALZET® Pumpen nach Explantation aus dem Versuchstier

A: Modell 2006. Zu sehen ist der mit einem roten Kreis markierte Pfropf, der vermutlich auf Grund einer Inkompatibilität zwischen gea_133 (in DMSO und PEG300) und den Körperflüssigkeiten der Maus entstanden ist.

B: Modell 2002. Bei dieser Pumpe ist auf Grund der Verwendung von gea_133x2HCl und der damit verbesserten Wasserlöslichkeit kein Pfropf zu sehen.

Die beobachtete Verklumpung könnte möglicherweise an einer Inkompatibilität zwischen der Wirkstofflösung (gea_133 in DMSO und PEG300) und der Körperflüssigkeit der Maus liegen. So könnte der lipophile Wirkstoff gea_133 in der hydrophilen Körperflüssigkeit ausgefallen sein und die Pumpe verstopft haben. Die Lipophilie eines basischen Stoffes lässt sich zum Beispiel durch die Überführung in das Hydrochlorid senken. Daher wurde gea_133 mit Chlorwasserstoff zum Dihydrochlorid gea_133x2HCl

umgesetzt. Der so entstandene weniger lipophile Wirkstoff wurde zunächst in DMSO als Stammlösung gelöst. Diese Lösung war nun in gleichen Teilen mit isotonischer Kochsalzlösung mischbar und der Wirkstoff sollte bei Kontakt mit Körperflüssigkeiten nicht mehr ausfallen.

Die Pumpe 2006 war vor allem wegen ihrer langen Verweildauer von 6 Wochen ausgewählt worden. Da mit dieser Pumpe jedoch keine Wirkstoffspiegel in Blut und Gehirn der Versuchstiere messbar waren, wurde neben der Veränderung der Lösbarkeit des Wirkstoffes auch eine Pumpe mit höherer Förderrate, dafür kürzerer Verweildauer verwendet. Die Wahl fiel auf das Modell 2002, da diese Pumpe eine dreimal so hohe Förderrate gegenüber dem Modell 2006 aufweist und damit höhere Wirkstoffspiegel in Blut und Gehirn zu erwarten sind. Auch hier sollte vor Start des Langzeitexperimentes untersucht werden, ob messbare Wirkstoffkonzentrationen in Blut und Gehirn nachgewiesen werden können. Um die Wirkstoffspiegel im *steady state* zu bestimmen wurden die Spiegel 5 Tage nach Implantation der Pumpe bestimmt. Bei dieser Pumpe und der Verwendung des Dihydrochlorids $\text{gea_133} \times 2\text{HCl}$ war im Gegensatz zum ersten Experiment mit dem Modell 2006 keine Verklumpung feststellbar (vgl. Abb. 38B, Seite 89). Die Spiegel von gea_133 in Blut und Gehirn sind im folgenden Kapitel beschrieben.

3.3.4 Versuche zur Frage der Resorption

Für einen systemischen Effekt eines Arzneistoffes muss dieser zunächst in die Blutbahn gelangen (147). Die Resorption ist daher eine äußerst wichtige pharmakologische Eigenschaft. Die Resorption von gea_133 wurde nach einmaliger Gabe über verschiedene Applikationswege untersucht. Um gleichzeitig die Überwindung der Blut-Hirn-Schranke zu bestimmen, wurde nicht nur Blut, sondern auch das Gehirn der behandelten Tiere entnommen. Diese Proben wurden anschließend nach einer speziellen Festphasenextraktionsmethode (siehe Kapitel 2.8.2.3, Seite 56) aufbereitet und mit Hilfe eines GC-MS-Gerätes vermessen. Auf diese Weise konnte die Konzentration von gea_133 in Blut und Gehirnproben bestimmt werden (vgl. Abb. 39, Seite 91). Außerdem konnte gezeigt werden, dass die Substanz gea_133 in der Lage ist die Blut-Hirn-Schranke zu überwinden.

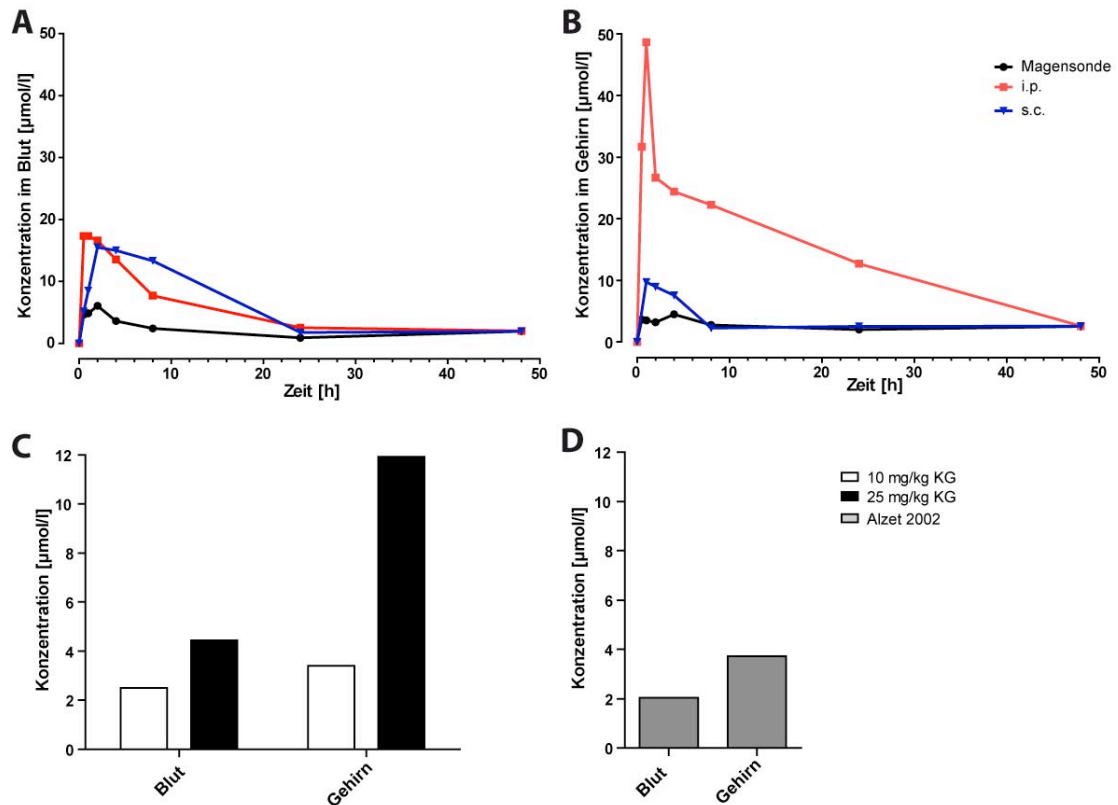


Abb. 39: Konzentration von gea_133 in Blut und Gehirn von C57/Bl6 Mäusen

Konzentration von gea_133 in weiblichen, 8 Wochen alten C57/Bl6 Mäusen nach Verabreichung von gea_133 (100 mg/kg Körpergewicht) in der angegebenen Applikationsart in Blut (A) und Gehirn (B).

Konzentration von gea_133 1 h nach intraperitonealer Injektion (C) und von gea_133x2HCl 5 Tage nach Implantation der ALZET® Pumpe 2002 (D).

Die maximale Konzentration bei intraperitonealer Injektion beträgt im Blut 18 µmol/L und Gehirn 49 µmol/L, bei subkutaner Verabreichung im Blut 17 µmol/L und Gehirn 10 µmol/L und bei Applikation per Magensonde im Blut 6 µmol/L und Gehirn 5 µmol/L. Die parenterale Applikation führt demnach zu deutlich höheren Wirkstoffspiegeln in Blut und Gehirn als die enterale Verabreichung (vgl. Abb. 39B, Seite 91). Außerdem zeigt sich ein Unterschied der Wirkstoffspiegel im Gehirn zwischen subkutaner und intraperitonealer Injektion. Die subkutane Verabreichung ist durch eine langsame Verteilungsgeschwindigkeit gekennzeichnet. Die verhältnismäßig niedrigen Wirkstoffspiegel bei subkutaner Injektion könnten daher eventuell auf einer Kombination von langsamer Verteilung und starker Metabolisierung beruhen. Eine andere Erklärung der niedrigen Spiegel wäre, dass die Substanz nach subkutaner Injektion, analog der Ver-

klumpung an der Pumpe, im Körper ausfällt und die Freisetzung aus diesem "Depot" nur sehr langsam verläuft.

Als nächstes sollte untersucht werden, in welchen Konzentrationen gea_133 in Gehirn und Blut vorliegt, wenn die Dosis auf ein Viertel (25 mg/kg Körpergewicht) bzw. ein Zehntel (10 mg/kg Körpergewicht) der ursprünglich verabreichten Dosis reduziert wird. Die Wirkstoffspiegel in Blut und Gehirn wurden 1 Stunde nach intraperitonealer Verabreichung, sowie unter Verwendung osmotischer Pumpen (Alzet[®] 2002) vermessen. Bei einer i. p. Dosis von 25 mg/kg Körpergewicht konnte eine Wirkstoffkonzentration von 12 µM im Gehirn bestimmt werden. Bei der i. p. Verabreichung von 10 mg/kg Körpergewicht konnten, ebenso wie bei der subkutanen Applikation über osmotische Pumpen (Alzet[®] 2002), nur äußerst geringe Konzentrationen von gea_133 in Blut und Gehirn gemessen werden. Diese geringen Konzentrationen liegen bereits im unteren Bereich der Nachweisgrenze, weshalb die subkutane Wirkstoffapplikation mit Hilfe von osmotischen Pumpen nicht weiter verfolgt wurde.

3.4 Therapiestudie mit gea_133

Neben dem Wirksamkeitsnachweis in Zellkulturversuchen (siehe Kapitel 3.2, Seite 76f) ist es notwendig, diesen Nachweis auch im Tiermodell zu erbringen. Die Ergebnisse der Untersuchungen in Kapitel 3.3.3 und 3.3.4 ergaben, dass eine enterale Applikation oder die subkutane Verabreichung mit Hilfe osmotischer Pumpen nicht zielführend sind. Daher sollten die transgenen Mäuse nun mittels intraperitonealer Injektion behandelt werden. Das Dosierungsschema orientiert sich an einer ausreichend häufigen Applikation für die Aufrechterhaltung therapeutischer Wirkstoffkonzentrationen bei gleichzeitig möglichst geringer Stressbelastung der Tiere. Daher wurden die Tiere 3x wöchentlich mit einer Dosis von 100 mg/kg Körpergewicht über 2 Monate (vgl. Abb. 40A, Seite 93) behandelt.

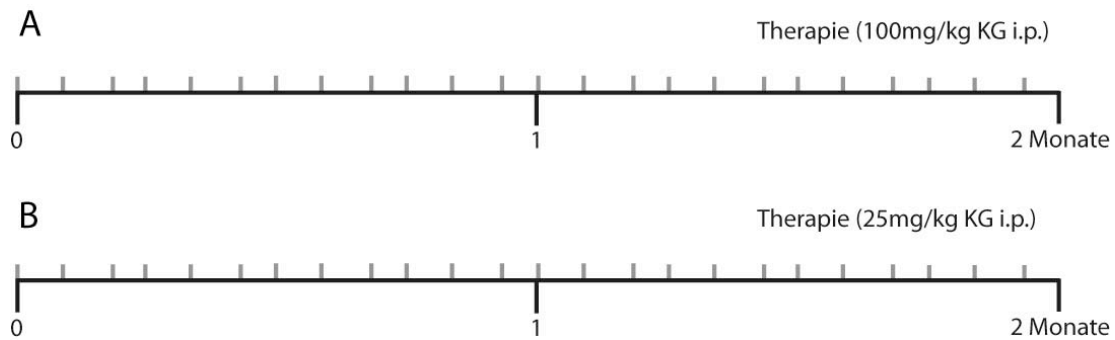


Abb. 40: Therapieplan für gea_133 an transgenen Mäusen

A: Therapieplan mit 100 mg/kg KG, 3x wöchentlich über 2 Monate.

B: Therapieplan mit 25 mg/kg KG, 3x wöchentlich über 2 Monate.

In der dritten Woche der Behandlung mit gea_133 (100mg/kg KG) sind von 6 behandelten Mäusen der Linie APPPS1 Δ E9 3 Tiere und von 5 behandelten Mäusen der Linie APPPS1 2 Tiere gestorben. Die Behandlung der restlichen Tiere wurde umgehend gestoppt. Versuchstiere, die mit Lösungsmittel (DMSO) behandelt wurden, wiesen keine Zeichen toxischer Nebenwirkungen auf. Um diese plötzlich auftretende Toxizität genauer zu untersuchen, wurden die Organe der Tiere makroskopisch und histologisch untersucht (siehe Kapitel 3.4.2).

Im Rahmen der Toxizitätsstudie hatte sich gea_133 als gut verträglich erwiesen, eine akute Toxizität konnte nicht nachgewiesen werden (vgl. Kapitel 3.3.2). Der plötzliche Tod einiger Versuchstiere bei längerer Applikation des Wirkstoffes lässt sich am ehesten mit einer Akkumulation des Wirkstoffes oder einer seiner Metabolite erklären. In einer zweiten Therapiestudie wurde daher die Wirkung von gea_133 mit einem Viertel der ursprünglichen Dosis (25 mg/kg KG) untersucht. Auch hier starben nach einer Therapiedauer von 17 Tagen 2 von 6 behandelten Mäusen der Linie APPPS1 Δ E9 und 2 von 4 behandelten Mäusen der Linie APPPS1. Die übrigen Versuchstiere wurden ebenfalls getötet und die Plaquegröße und -dichte in Kortex und Hippocampus bestimmt.

3.4.1 Einfluss auf Plaquegröße und -dichte

Eine Standardgröße für die Bestimmung der Wirksamkeit einer Substanz im Tiermodell für Morbus Alzheimer ist die Untersuchung des Effektes auf die Plaquegröße und Plaquedichte. Hier wurden zwei verschiedene AD-transgene Mauslinien verwendet. Bei der Linie APPPS1 Δ E9 treten Plaques ab einem Alter von circa 4-5 Monaten auf. Die

andere Mauslinie, APPPS1, hingegen besitzt einen weit aggressiveren Krankheitsverlauf. Erste Plaques treten bei dieser transgenen Maus bereits ab einem Alter von 6-8 Wochen auf. Die Größe und die Menge an Plaques steigen schnell an. Somit wurden hier zwei Modelle untersucht, bei denen sowohl der Effekt zu Beginn der Pathologie als auch zu einem späteren Zeitpunkt untersucht werden konnte. Die Größe und Dichte von Plaques in Kortex und Hippocampus wurde für beide Linien nach einer Behandlungsdauer von 17 Tagen mit gea_133 bestimmt.

APPPS1ΔE9

Üblicherweise werden bei Untersuchungen im Tiermodell Wurfgeschwister verglichen, da diese das gleiche Alter haben und nur geringe genetische Unterschiede besitzen. Wurfgeschwister standen jedoch wegen der verstorbenen Tiere nicht mehr für eine Untersuchung zur Verfügung. Um zu überprüfen, ob der gemessene Unterschied in der Anzahl der Plaques (vgl. Abb. 41C, Seite 95) auf dem unterschiedlichen Alter der Versuchstiere beruht, wurde die Plaquedichte gegen das Alter der verschiedenen Versuchstiere in einem Graphen aufgetragen. Da eine exponentielle Kurve durch sämtliche Punkte des Graphen gelegt werden konnte (vgl. Abb. 41D, Seite 95), ist die Anzahl der Plaques nur durch das Alter der Tiere und somit dem Fortschreiten der Pathologie bestimmt. Die Behandlung mit gea_133 bewirkt, zumindest über diesen kurzen Zeitraum, keine signifikante Veränderung der Plaquedichte und -größe (vgl. Abb. 41, Seite 95).

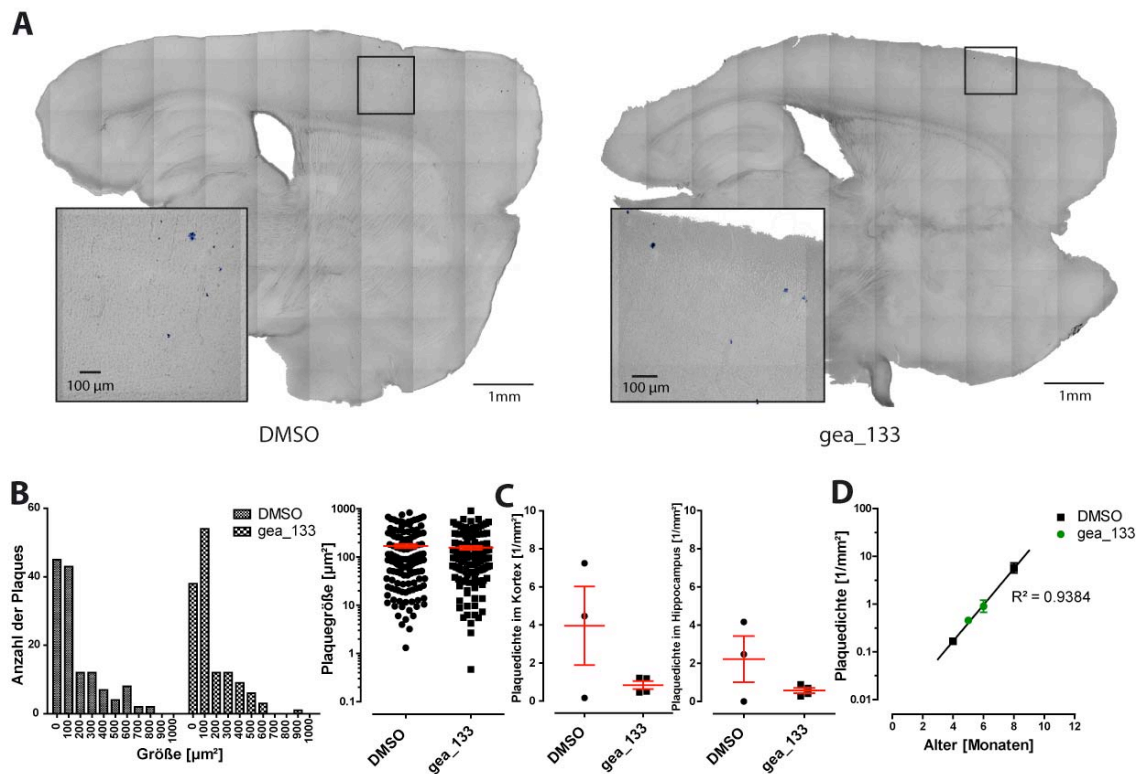


Abb. 41: Einfluss von gea_133 auf die Plaquegröße und -dichte in APPPS1ΔE9-Mäusen

A: Repräsentative Sagittalschnitte mit blau eingefärbten Aβ-Plaques. Insert mit vergrößerter Darstellung.

B: Plaquegrößenverteilung und absolute Größe.

C: Plaquedichte in Kortex und Hippocampus.

D: Halblogarithmische Darstellung der Plaquedichte gegen das Alter der mit DMSO (schwarz) oder gea_133 (grün) behandelten Tiere.

APPPS1

Für die Bestimmung der Plaquegröße und -dichte in dem Mausmodell APPPS1 ergab sich nicht das gleiche Problem wie bei der Mauslinie APPPS1ΔE9. Hier konnten Wurfgeschwister für die Auswertung verwendet werden. In Abb. 42B, auf Seite 96 ist die Plaquegrößenverteilung, die absolute Größe und die Dichte der Plaques von behandelten und unbehandelten Tieren dargestellt. Bezüglich der Größe und der Dichte der Plaques konnte kein signifikanter Unterschied zwischen behandelten und nicht behandelten Tieren festgestellt werden (Abb. 42C, Seite 96).

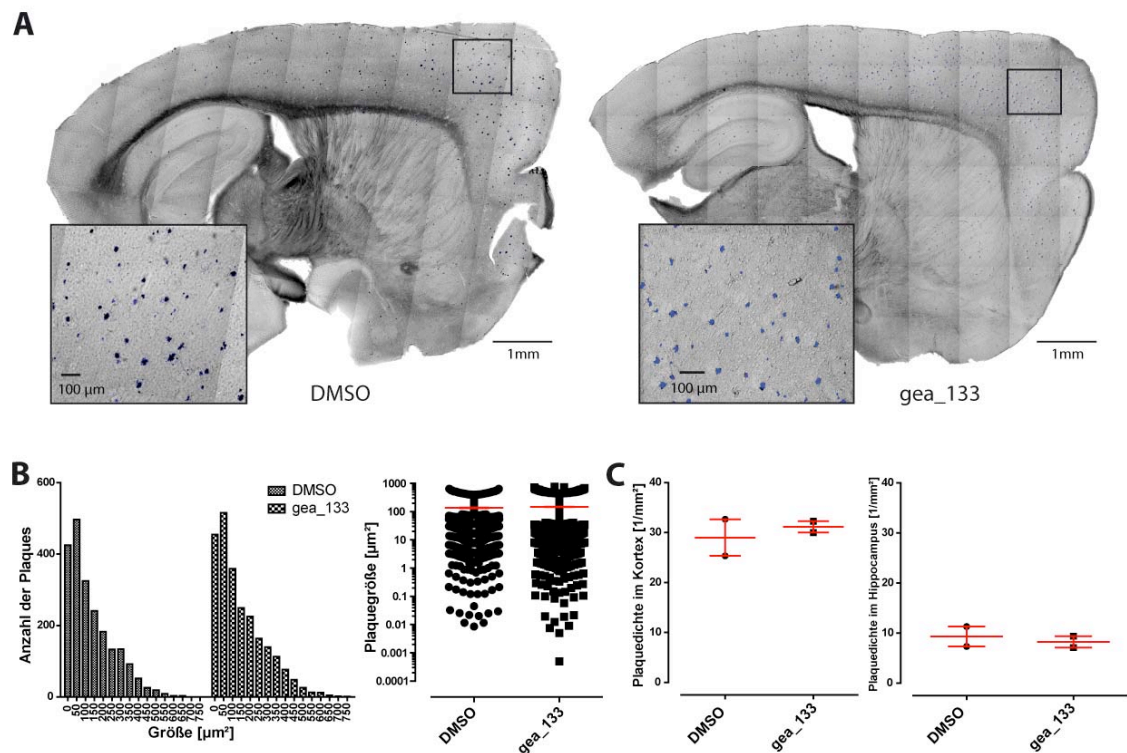


Abb. 42: Einfluss von gea_133 auf die Plaquesgröße und -dichte in APPPS1-Mäusen

A: Repräsentative Sagittalschnitte mit blau eingefärbten A β -Plaques. Insert mit vergrößerter Darstellung.

B: Plaquesgrößenverteilung und absolute Größe.

C: Plaquesdichte in Kortex und Hippocampus.

Eine mögliche Erklärung für die mangelnde Wirksamkeit von gea_133 ist die kurze Behandlungsdauer. Des Weiteren könnte die hohe Dosis des Wirkstoffes für die bereits beschriebenen toxischen Effekten verantwortlich sein. Diese Effekte wiederum machten den vorzeitigen Abbruch des Therapieversuches notwendig.

3.4.2 Histopathologische Untersuchung

Histologische Untersuchungen der inneren Organe der im Rahmen der Behandlung mit gea_133 verstorbenen Tiere sollten Aufschluss über die Todesursache geben. Zu diesem Zweck wurden die entsprechenden Organe präpariert, mit PFA fixiert und in Paraffin eingebettet. Es wurden 4 µm dicke histologische Schnitte angefertigt und gemäß der Hämatoxylin-Eosin Methode gefärbt.

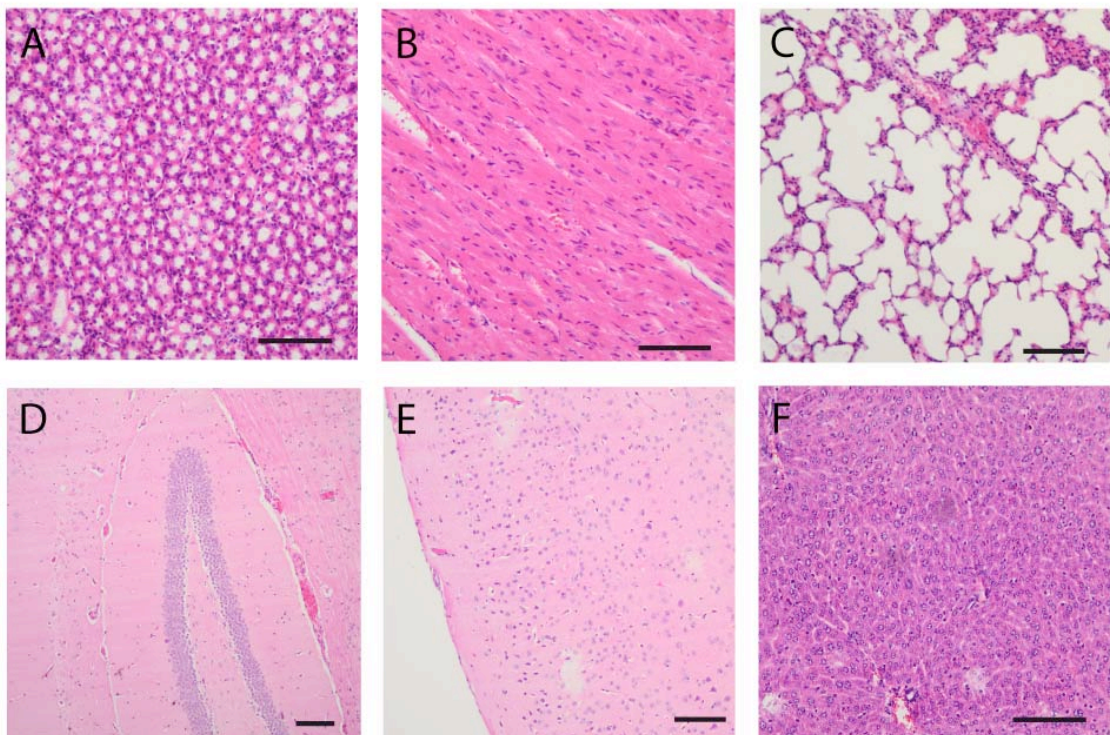


Abb. 43: Repräsentative histologische Präparate unterschiedlicher Organe eines Tieres der Kontrollgruppe

HE-Färbungen von Niere (A), Herz (B), Lunge (C), Hippocampus (D), Kortex (E) und Leber (F) einer mit DMSO behandelten Kontrollmaus der Linie APPPS1. Maßstabsbalken: 100 µm

Niere, Herz, Lunge und Gehirn (Hippocampus und Kortex) zeigten bei den mit Wirkstoff behandelten Tieren keine pathologischen Veränderungen (Abb. 44A-E, Seite 98). In der Leber der behandelten Tiere konnte jedoch eine deutliche Nekrose des Gewebes beobachtet werden (Abb. 44F, Seite 98).

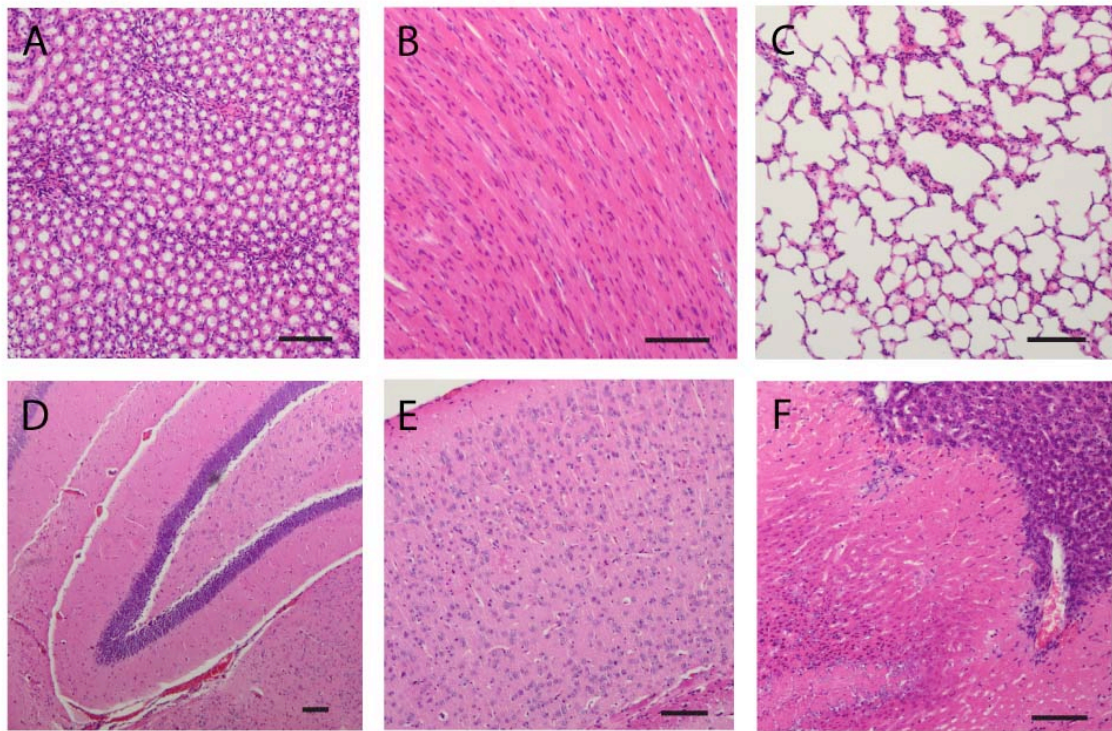


Abb. 44: Repräsentative histologische Präparate unterschiedlicher Organe eines Tieres der Versuchsgruppe

HE-Färbungen von Niere (A), Herz (B), Lunge (C), Hippocampus (D), Kortex (E) und Leber (F) einer mit gea_133 behandelten Maus der Linie APPPS1. In der Leber (F) ist eine deutliche Nekrose des Leberparenchyms zu erkennen, im rechten oberen Teil befinden sich vitale Leberzellen.

Maßstabsbalken: 100 μ m

4 Diskussion

4.1 Arzneimittelforschung

In der pharmazeutischen Forschung liegt der Fokus in der Entdeckung neuer Wirkstoffe und der Entwicklung innovativer Arzneimittel, sowie der spezifischen Suche nach wirksameren Wirkstoffen beziehungsweise Wirkstoffkombinationen und neuen Anwendungsgebieten von bereits bestehenden Medikamenten. Die Erfolgchancen auf Heilung sind bei gut verstandenen Erkrankungen am höchsten (159), folglich steht am Anfang jeder erfolgsversprechenden Therapie die umfassende Erforschung der Erkrankung, samt der zu Grunde liegenden Mechanismen. In dieser Hinsicht stellt die pharmazeutische Grundlagenforschung mit der Charakterisierung von physiologischen und pathologischen Mechanismen den ersten Schritt in dem langen Entwicklungsweg eines Wirkstoffes bis hin zum neuen Medikament dar. Gelingt die Identifizierung der Mechanismen, welche als ursächlich oder fördernd für den jeweiligen Krankheitsverlauf gelten, beginnt die gezielte Forschung nach neuen Wirkstoffen die diese adressieren. Die Modulation, Hemmung oder Aktivierung der entsprechenden Zielproteine führt idealerweise zu einer Heilung der Krankheit oder zumindest zu einer Linderung der Symptome. Die einzelnen Entwicklungsschritte eines chemischen Stoffes bis hin zum Medikament sollen im Folgenden beschrieben werden.

Leitstruktursuche

Die Identifizierung von Leitstrukturen ist ein zentraler Ausgangspunkt in der Arzneistoffentwicklung. Unter einer Leitstruktur versteht man einen chemischen Stoff, der *in vitro* bereits eine gewünschte biologische Aktivität zeigt. Im Bezug auf Wirkstärke, Selektivität und pharmakokinetischen Eigenschaften besteht jedoch noch Optimierungsbedarf (159). Die aus der Erforschung neuer Wirkstoffe abgeleiteten empirischen Regeln bilden auch heute noch die Wissensbasis für das rationale Design von Arzneimitteln.

Zu Beginn des 18. Jahrhunderts wurden Arzneimittel vor allem durch Testung unter *in vivo* Bedingungen am Menschen entdeckt. Es folgten die Isolierung von pflanzlichen, beziehungsweise tierischen Giften und Inhaltsstoffen und deren Weiterentwicklung zu Arzneimitteln. So beruht die Entdeckung des Penicillin durch Alexander Fleming auf

seiner Feststellung, dass einige Mikroorganismen, in diesem Fall der Schimmelpilz *Penicillium chrysogenum*, eine keimtötende Wirkung besitzen (160). Der nächste Schritt in der Geschichte der Arzneimittelforschung war die Untersuchung von Farbstoffen und Zwischenprodukten der chemischen Synthese auf deren Effekte im menschlichen Körper. Dies führte zum Beispiel zu der Identifizierung von Suramin für die Behandlung der Schlafkrankheit (161). Ein wichtiger Schritt, der bis heute in der Forschung Bestand hat, ist die Nachbildung endogen vorkommender Liganden (*ligand-based drug design*). Für die Entwicklung von Enzyminhibitoren werden dabei zum Beispiel Übergangszustände der Reaktion imitiert, wodurch die Reaktion zum Erliegen kommt (147).

Die kombinatorische Chemie und die Kenntnis immer vielfältigerer Naturstoffe führten zu einem extremen Anstieg der Zahl möglicher Testsubstanzen. Um aktive Moleküle für bestimmte Indikationen herauszufiltern, ist ein zeitaufwändiges und kostenintensives Durchmustern (Screening) der Substanzbibliotheken notwendig (159). Dies führte zu der Entwicklung von Methoden, bei denen eine große Zahl an Molekülen auf ihre biologische Aktivität hin untersucht werden kann, dem sogenannten *High-Throughput-Screening* (HTS). Um die strukturellen Voraussetzungen von Testsubstanzen für ein solches Screening zielgerichtet auf die Wirkung an einem bestimmtem Zielprotein auszuwählen wird mittlerweile dem HTS oft ein *virtual screening* vorangestellt. Hiermit werden die Testsubstanzen und das Zielprotein virtuell am Computer nachgebildet und im Rahmen einer Simulation auf mögliche Interaktionen untersucht. Mit diesen Verfahren werden aus einer großen Substanzbibliothek jene Moleküle ausgewählt, die prinzipiell in die Bindungstasche des Zielproteins passen (Docking-Studie). Als großer Vorteil dieser Methode ist die Zeit- und Kostenersparnis durch kleinere Substanzbibliotheken zu sehen. Im Gegensatz dazu stellt die Tatsache, dass die Raumstruktur des Zielproteins bekannt sein muss, definitiv einen Nachteil dar.

Wirkstoffkandidat

Ist eine Leitstruktur erst einmal identifiziert, besteht die Herausforderung darin, diese zu einem Wirkstoffkandidat zu modifizieren. Hierfür ist es notwendig, basierend auf der Leitstruktur, durch gezielte chemische Variationen wirksamere oder selektivere Analoga herzustellen. Im Zuge dessen werden die für die Wirkung erforderlichen strukturellen Merkmale identifiziert und in das Molekül integriert. Die wichtigsten Testkriterien sind die Bindung an das Zielprotein, die Löslichkeit, sowie die Toxizität, Verteilung

und der Abbau im Organismus. Nach jeder Veränderung des Moleküls erfolgt eine erneute Testung, um die Zusammenhänge zwischen chemischer Struktur und biologischer Wirkung besser zu verstehen.

Präklinische und klinische Untersuchung

Wenn eine erfolgsversprechende Substanz identifiziert werden konnte, muss deren Unbedenklichkeit in präklinischen Studien gezeigt werden. Hierbei werden vor allem die akute und chronische Toxizität, sowie eventuelle kanzerogene oder teratogene Eigenschaften in zwei verschiedenen Tierarten untersucht. Fallen diese Untersuchungen positiv aus, folgen klinische Untersuchungen zu Verträglichkeit und Wirksamkeit an gesunden Probanden und Patienten. Die Genehmigung einer Studie wird in der Regel nur dann erteilt, wenn die vorangegangene Studienphase erfolgreich abgeschlossen wurde. In klinischen Studien Phase-I erfolgt zunächst die Bestimmung der Pharmakokinetik, Pharmakodynamik, Verträglichkeit und Sicherheit eines Arzneimittels an gesunden, meist männlichen Probanden. Die darauf folgende Phase-II dient der Überprüfung des Therapiekonzeptes und der Findung der geeigneten Therapiedosis an circa 50 bis 200 Patienten. Das Ziel klinischer Studien Phase-III ist der signifikante Wirkungsnachweis an 200 bis 10000 Patienten und führt im Erfolgsfall zur Marktzulassung der Therapie. Klinische Studien der Phase-IV finden mit bereits zugelassenen Medikamenten statt und dienen unter anderem der Findung sehr seltener Nebenwirkungen, die erst in sehr großen Patientenkollektiven erkannt werden können.

4.2 Arzneimittelforschung bei Morbus Alzheimer

Die Entwicklung einer Therapie des Morbus Alzheimer ist eine der großen Herausforderungen für die Pharmaforschung. Bis heute ist es noch nicht gelungen Therapien, welche das Fortschreiten der Demenz dauerhaft verlangsamen, verhindern oder gar heilen, zu entwickeln. Die Ursache hierfür liegt vermutlich in der Problematik, dass die typischen klinischen Symptome des Morbus Alzheimer erst zu einem Zeitpunkt auftreten, an dem der Krankheitsverlauf bereits zu weit fortgeschritten ist.

4.2.1 Mechanismus

Für ein besseres Verständnis der Krankheit wurden zunächst deren ursächliche Mechanismen und neuropathologischen Korrelate wie Alzheimer-Plaques, Neurofibrillen und der Verlust funktionsfähiger Neurone untersucht. Dies führte zu der Identifizierung hochorganisierter Proteinaggregate bestehend aus dem A β -Peptid beziehungsweise dem Protein Tau.

A β -Peptide neigen dazu mit sich selbst zu aggregieren und anschließend als unlösliche Komplexe abgelagert zu werden. A β -Peptide stellen den Hauptbestandteil der Alzheimer-Plaques dar (162). Deren Bildung und Entstehung sind daher wichtige Angriffspunkte der pharmazeutischen Forschung. A β -Plaques sind wahrscheinlich nicht die direkten Mediatoren der Toxizität. Mittlerweile werden lösliche A β -Peptidoligomere als wichtige Vermittler der Toxizität angesehen (163). A β -Peptide werden mit Hilfe von Proteasen aus dem Vorläuferprotein APP herausgeschnitten (44). Hierbei werden drei verschiedene Proteasen unterschieden: die α -, β - und γ -Sekretase. Die α -Sekretase zerschneidet die Amyloiddomäne und verhindert damit die Entstehung von A β -Peptiden. Die α -Sekretase agiert bei der Prozessierung von APP in Konkurrenz mit der β -Sekretase. Die kombinierte Aktion von β - und γ -Sekretase führt zu der Bildung von A β -Peptiden, welche anschließend aus der Nervenzelle ausgeschieden werden (164). Die primären Zielproteine der Pharmaforschung sind daher die β - und γ -Sekretase. Eine Inhibierung dieser Proteasen verhindert die Bildung toxischer A β -Peptide und sollte daher den Krankheitsverlauf positiv beeinflussen, wenn nicht gar die Entstehung verhindern. Ein grundsätzliches Problem von Sekretase-Inhibitoren sind jedoch die physiologischen Funktionen der Sekretasen. In der Tat zeigten sich bei der klinischen Untersuchung von γ -Sekretase-Inhibitoren massive Nebenwirkungen bei Patienten der Verumgruppe. Diese beruhen sehr wahrscheinlich auf einer Interaktion der γ -Sekretase mit dem Notch-Signalweg (38). Anschließend wurden einerseits Modulatoren der Sekretasen untersucht, die diesen Effekt nicht besitzen, andererseits wurde versucht, mit Hilfe von Impfstoffen die Menge an entstandenen A β -Peptiden zu verringern. Die erhofften Effekte auf Gedächtnisleistung und Alltagskompetenzen blieben jedoch aus (165).

Während A β -Plaques außerhalb der Nervenzellen auftreten, finden sich in der Nervenzelle neurofibrilläre Bündel, die vornehmlich aus dem fehlgefalteten Protein Tau beste-

hen. Das Tau-Protein ist an sich sehr gut löslich und seine hauptsächliche physiologische Funktion besteht in der Stabilisierung von Mikrotubuli in Axonen (166). Im gesunden Gehirn besitzt Tau etwa 2-3 Phosphatgruppen. Das Phosphorylierungslevel bei Morbus Alzheimer ist mit etwa 9 Phosphatgruppen pro Molekül signifikant erhöht (167). Auf Grund dieser Hyperphosphorylierung assembliert Tau bei Morbus Alzheimer und anderen Tauopathien zu abnormen Fasern (*paired helical filaments*, PHF), welche wiederum in Neuronen höher vernetzte Aggregate (neurofibrilläre Bündel) bilden (164). Die wichtigsten Tau-Kinasen sind GSK-3 β (Glykogen Synthase Kinase 3 β), CDK5 (Cyclin-abhängige Kinase 5), PKA (Proteinkinase A), MAPK (mitogenaktivierte Proteinkinase), CaMK II (Calcium/Calmodulin-abhängige Kinase Typ 2) und MARK (MAP/Mikrotubuli-Affinität regulierende Kinase) (168–173). Daher wird verstärkt nach Inhibitoren der Tau-Aggregation beziehungsweise Inhibitoren der Tau-phosphorylierenden Kinasen als potentielle krankheitsmodifizierende Wirkstoffe bei Morbus Alzheimer gesucht. Bis zum jetzigen Zeitpunkt ist allerdings noch nicht klar, welche dieser Kinasen am wichtigsten in der Pathogenese des Morbus Alzheimer sind. Es besteht außerdem die Möglichkeit, dass mehrere Kinasen an der Hyperphosphorylierung von Tau beteiligt sind. Daher kann die selektive Inhibition einer einzelnen Kinase vermutlich nicht vor den schädlichen Folgen der Hyperphosphorylierung von Tau schützen. Die Entwicklung von unselektiven Kinaseinhibitoren trägt jedoch ein erhöhtes Risiko von Nebenwirkungen. Selbst die selektive Inhibition von GSK-3 β oder CDK5 besitzt ein nicht zu unterschätzendes Risiko an Nebenwirkungen, da diese Kinasen zusätzliche, wichtige zelluläre Funktionen regulieren (174, 175).

4.2.2 Stand der Entwicklung von neuen Therapieansätzen

Verringerung der A β -Peptid Spiegel

Semigacestat ist ein γ -Sekretase-Inhibitor der im Tiermodell in der Lage ist, die A β -Peptid-Spiegel in Plasma und CSF zu senken (176). Zwei daraufhin durchgeführte große klinische Studien mit mehr als 3000 Patienten mussten jedoch wegen starker Nebenwirkungen wie Immunsuppression und dem Auftreten von Hautkrebs gestoppt werden (48, 89). Diese Probleme sind zumindest teilweise einer Interaktion mit dem Signalweg von Notch zuzuschreiben (38, 46). Avagacestat, ein daraufhin entwickelter selektiver γ -Sekretase-Inhibitor zeigte in Phase-II der klinischen Untersuchung jedoch

keine Wirksamkeit gegenüber Placebo (96). Bristol Myers Squibb untersucht nach einer vielversprechenden ersten klinischen Phase derzeit den Wirkstoff Begacestat (95).

Weggen et al. konnte zeigen, dass mehrere NSAIDs, wie Ibuprofen und Flurbiprofen die Produktion von A β 42 in Richtung A β 38 verschieben und somit auf eine Art und Weise wirken, wie es von γ -Sekretase-Modulatoren zu erwarten wäre (98). Während jeweils nur das (S)-Enantiomer dieser Verbindungen COX inhibiert, konnte gezeigt werden, dass sowohl das (R)- als auch das (S)-Enantiomer gleichermaßen die Produktion von A β -Peptiden (177) und Defizite im räumlichen Lernvermögen von Tg2576-Mäusen verringern (178). Daraufhin wurde das (R)-Enantiomer von Flurbiprofen in einer klinischen Studie mit über 1800 Patienten über einen Zeitraum von 18 Monaten getestet. Eine eindeutige Wirksamkeit konnte jedoch nicht nachgewiesen werden (179).

May et al. konnte zeigen, dass der β -Sekretase-Inhibitor LY2811376 in APP(V717F)-Mäusen die Spiegel von A β -Peptiden, APPs β und C99 verringert. Obwohl der Wirkstoff im Menschen gut verträglich ist, machte das Auftreten toxischer Nebenwirkungen in präklinischen Langzeitstudien die Beendigung weiterer Untersuchungen notwendig (105). Weitere Firmen, zum Beispiel Merck (MK8931), haben 2012 die Untersuchung neuer BACE-Inhibitoren gestartet. Prinzipiell besteht die Möglichkeit, dass BACE-Inhibitoren klinisch erfolgreich sein können, dafür müssen diese jedoch hochselektiv und potent sein (106).

Verhinderung der A β -Aggregation

Die Aggregation von A β -Peptiden zu beeinflussen hat gegenüber einer Enzyminhibition den Vorteil, dass die Wahrscheinlichkeit für das Auftreten von Nebenwirkungen bedeutend geringer ist, da bis heute für A β keine physiologischen Funktionen bekannt sind. Gervais et al. konnten zeigen, dass Tramiprosat die Fibrillen-Bildung von A β in Tg2576-Mäusen verhindern kann (107). In einer klinischen Phase-III Studie konnte jedoch keine Wirksamkeit gegenüber Placebo gezeigt werden. ELND005, ein Stereoisomer von Inositol verhindert die Akkumulation von A β -Oligomeren und ist in der Lage die Toxizität von A β im Hippocampus von Mäusen zu vermindern. In anschließenden klinischen Studien blieben die erhofften Effekte jedoch aus (110).

Immuntherapie

Die aktive und passive Immunisierung von transgenen Alzheimer-Mäusen führt zu einer raschen Beseitigung von A β -Plaques (113). Die Erwartungen an eine entsprechende Behandlungsstrategie am Menschen waren folglich hoch. Die klinische Untersuchung von AN1792 (aktive Immunisierung) musste jedoch wegen gravierenden Nebenwirkungen vorzeitig gestoppt werden, da 6 Prozent der Studienteilnehmer eine vermutlich T-Zell-vermittelte Meningoenzephalitis entwickelten. Möglicherweise besitzt das A β 42-Peptid Epitope, die humane T-Zellen aktivieren können (115).

Der Vorteil der passiven Immunisierung ist, dass hierbei eine mögliche Induktion einer Autoimmunerkrankung umgangen wird. Hierfür werden Antikörper gegen spezifische Regionen des A β -Peptids entwickelt. Die beiden wichtigsten Wirkstoffe sind die humanisierten, monoklonalen Anti-A β -Antikörper Bapineuzumab und Solanezumab. Die klinische Untersuchung von Bapineuzumab zeigte jedoch keine signifikanten Unterschiede gegenüber Placebo in den primären Endpunkten der Studie. In höheren Dosierungen traten als Nebenwirkung vasogene Hirnödeme auf, weswegen die weitere Untersuchung gestoppt wurde (117). Solanezumab ist ein Antikörper, der spezifisch gegen A β 13-28 gerichtet ist und unterscheidet sich in mehreren Punkten von Bapineuzumab: (1) Solanezumab erkennt spezifische Epitope im zentralen Teil des Peptids, (2) während Bapineuzumab vermehrt an A β -Plaques bindet, bindet Solanezumab selektiv an lösliche A β -Peptide, (3) Solanezumab zeigt wie es scheint weniger ZNS-Nebenwirkungen (115). Die Ergebnisse zweier Phase-III Studien ergaben nun, dass, obwohl die primären Endpunkte nicht erreicht worden sind, Patienten mit leichten Formen der Erkrankung von der Verabreichung von Solanezumab profitieren.

4.2.3 Morbus Alzheimer ist eine chronisch progressive Erkrankung

Morbus Alzheimer ist eine chronisch progressive Erkrankung. Ablagerungen von A β -Peptiden und Tau treten bereits über 20 Jahre vor Eintritt der klinischen Symptomatik auf (165). Ein möglicher Grund für das Scheitern der meisten klinischen Studien ist, dass mit der Therapie zu einem Zeitpunkt begonnen worden ist, bei dem die Krankheit bereits zu weit fortgeschritten war. Die Krankheit ist hier möglicherweise in einer Phase, in der die Medizin nicht mehr entscheidend eingreifen kann. In zukünftigen Studien

soll daher der therapeutische Effekt von Wirkstoffen in früheren, eventuell sogar prä-dementiellen Stadien der Erkrankung untersucht werden (119). Das aber setzt auch eine verbesserte Diagnostik voraus, die den Ausbruch der Krankheit schon viel früher erkennen lässt, als das heute möglich ist (180).

Eine andere Möglichkeit wäre, alle Personen ab einem gewissen Alter vorsorglich mit einem entsprechenden Wirkstoff zu behandeln. Selbst wenn ein geeigneter Wirkstoff für diesen Ansatz gefunden werden sollte, ist das Problem von eventuell auftretenden Nebenwirkungen nicht zu unterschätzen. Ein ähnliches Problem ergibt sich bei der prophylaktischen Verabreichung von Cholesterinsenkern („Statine“) zur Vermeidung kardiovaskulärer Ereignisse. Die Einnahme von Statinen führt nachweislich zu einer Reduktion im Auftreten kardiovaskulärer Ereignisse (181). Dennoch sollte die Verabreichung von Statinen nur nach strenger Indikationsüberprüfung erfolgen, da sämtliche Statine zu toxischen Myopathien (z.B.: Rhabdomyolyse) führen können (147).

Ein weiteres Problem sind die Wechselwirkungen mit anderen Medikamenten des oftmals multimorbiden Patientenkollektivs.

4.2.4 Der Verlust von Synapsen ist nicht reversibel

Obwohl in einigen Studien eine Verminderung der Anzahl an A β -Peptiden nachgewiesen werden konnte, blieb der gewünschte Effekt auf die Kognition aus (119). Eine Erklärung hierfür könnte sein, dass der Verlust von Synapsen und Neuronen im Gehirn nicht reversibel ist (182). Der Verlust von Synapsen gilt bis heute als das beste neurobiologische Korrelat der kognitiven Defizite bei Morbus Alzheimer. Die Zahl der Synapsen wird nicht nur durch absterbende Neuronen verringert, auch lebende Neuronen verlieren Synapsen (183). Der exakte Mechanismus der Nervenzelldegeneration ist bisher nur mäßig verstanden. Ein großes Problem ist, dass auf Grund von weitreichenden Kompensationsmechanismen klinisch erkennbare Symptome meist erst auftreten, wenn bereits mehr als zwei Drittel der vorhandenen Zellen bzw. Synapsen zerstört sind (182). Daher erscheint es wichtig, dass bei der Suche nach neuen Wirkstoffen für die Therapie des Morbus Alzheimer der Fokus auf Mechanismen gelegt wird, die dem Untergang von Synapsen vorausgehen, wie zum Beispiel der Regulation des Kalziumhaushaltes (184, 185).

4.3 High-Throughput-Screening

4.3.1 Allgemein

Wie bereits im vorangegangenen Kapitel beschrieben erfordert die Identifizierung einer geeigneten Leitstruktur die Durchforstung immer größerer Wirkstoffbibliotheken. Hierfür war die Entwicklung von automatisierten Testsystemen mit hohem Durchsatz (*high-throughput-screening*) notwendig. Das allgemeine Vorgehen beschreibt zunächst ein erstes Eingangsscreening, welches der Identifizierung sogenannter Primärhits dient. Um falsch-positive Ergebnisse zu identifizieren werden diese Primärhits erneut und in verschiedenen Konzentrationen vermessen. Als nächstes folgt ein vertieftes Screening mit Hilfe dessen der chemische Strukturraum untersucht werden soll. Hierbei gilt es erste Struktur-Wirkungsbeziehungen und pharmakologische sowie physikochemische Eigenschaften zu bestimmen. Aus diesen Ergebnissen werden dann eine oder mehrere Leitstrukturen identifiziert.

Es ist erwähnenswert, dass die Qualität eines Assays durch seine Robustheit und Reproduzierbarkeit definiert wird. Daher ist es wichtig, dass während der Methodenentwicklung die Konditionen und Abläufe des Assays so gewählt werden, dass das Auftreten von ungültigen Ergebnissen (z.B.: falsch-positiv) möglichst gering ist. Der prinzipielle Aufbau von HTS-Testsystemen lässt sich in zwei verschiedene Vorgehensweisen unterteilen, die im Folgenden dargestellt werden.

Target-basierte Verfahren

Bei den sogenannten Target-basierten Screening-Verfahren muss zunächst das zu adressierende Zielprotein (Target) identifiziert werden. Nachdem dieses validiert wurde, ist es die nächste Aufgabe Testsubstanzen zu identifizieren, die mit der Zielstruktur interagieren. Bei der direkten Methode wird zum Beispiel untersucht, ob die Testsubstanz in der Lage ist, einen markierten Liganden vom Zielprotein zu verdrängen. Bei der indirekten Methode wird dagegen untersucht, in wie weit eine Testsubstanz einen spezifischen Signalweg beeinflusst. Um eine solche Interaktion sichtbar zu machen, werden meist biochemische Detektionsmethoden wie Farbintensität, Lumineszenz und Fluoreszenz verwendet. Auf Grund der guten Möglichkeiten diese Verfahren zu automatisieren werden sie sehr häufig in der pharmazeutischen Industrie eingesetzt.

Phänotyp-basierte Verfahren

Das phänotypische Verfahren hingegen untersucht die Effekte von Testsubstanzen auf das Erscheinungsbild (Phänotyp) lebender Zellen oder Gewebe. Der Vorteil dieser Methode ist die Testung von Substanzen in einem krankheitsrelevanten Umfeld (186). So wird im Gegensatz zum Target-basierten Screening nicht die Interaktion einer Substanz mit einem einzelnen Protein untersucht, sondern dessen Wirkung auf die gesamte Zelle. Ein weiterer Vorteil ist, dass weder die genaue Wirkweise noch das molekulare Zielprotein von vornherein bekannt sein muss. Dies eröffnet daher die Möglichkeit für die gewählte Indikation neue Zielproteine oder Wirkmechanismen zu entdecken. Ein Nachteil ist die damit verbundene Notwendigkeit aufwändiger Folgestudien, die der Entschlüsselung des Zielproteins und des Wirkmechanismus dienen. Werden automatisierte Mikroskope eingesetzt spricht man auch von High-Content-Screening (187).

4.3.2 Kalzium-Screen

Der hier verwendete Kalziumscreen zählt zu der Klasse der phänotypischen High-Content-Screening-Verfahren. Er besitzt eine Reihe von Vorteilen gegenüber bisher verfügbaren Methoden der Kalziummessung im Hochdurchsatz. Zum einen wird ein Fluoreszenzmessverfahren verwendet, mit dem es möglich ist kleinste Änderungen der Kalziumkonzentration zu verfolgen. Herkömmlich verwendete Farbstoffe besitzen eine gewisse Eigentoxizität und machen mehrere Arbeitsschritte bei Einbringen und Auswaschung des Farbstoffes notwendig (188). Daher sind sie für Hochdurchsatzmessungen nur bedingt geeignet. Der verwendete genetische, FRET-basierte Kalziumindikator YC3.6 dagegen besitzt diese Nachteile nicht. Unterschiedliche Expressionsspiegel von YC3.6 der einzelnen Zellen können auf Grund der ratiometrischen Natur des Markers herausgerechnet werden (121). Die High-Content-Screening Plattform Opera® besitzt eine Klimakammer, die Temperatur, Luftfeuchtigkeit und CO₂-Level über einen langen Zeitraum konstant hält. Dies und die Verwendung von YC3.6 ermöglicht die Langzeitmessung intrazellulärer Kalziumströme.

Ein weiterer Vorteil liegt in der Detektion der Kalziumströme einzelner Zellen. So ist es möglich, im Gegensatz zu bisherigen Methoden, wie zum Beispiel FLIPR (189), kleinste Änderungen der Kalziumkonzentration auf Einzelzellebene zu messen. Außerdem können einzelne Zelltypen individuell untersucht werden. So ist unter anderem eine

getrennte Auswertung von reagierenden Zellen gegenüber nicht reagierenden Zellen möglich.

Die High-Content-Screening Plattform Opera[®] wurde zudem mit einem automatischen Dispensiersystem ausgestattet. Dies ermöglicht die Zugabe eines Agonisten (in der vorliegenden Studie Carbachol) ohne Unterbrechung der Aufnahmesequenz und ist damit für die Messung der Kinetik von Kalziumströmen über längere Zeit ideal geeignet.

4.4 Target-Identifizierung

Phänotypische Screeningverfahren untersuchen den Effekt von Testsubstanzen in krankheitsrelevanten Lebendzellmodellen. Dies macht im Anschluss Folgeuntersuchungen notwendig, bei der Zielprotein und Wirkmechanismus entschlüsselt werden müssen. Oft wird angenommen, dass eine Interaktion mit einem einzigen Zielprotein zu dem beobachteten phänotypischen Effekt führt. In der Praxis zeigt sich jedoch zunehmend, dass dieser Effekt auf einem Zusammenspiel von Interaktionen mit mehreren Proteinen beruht (190). Die Identifizierung der jeweiligen Zielproteine unterstützt auch den medizinisch-chemischen Optimierungsprozess der Leitstruktur bezüglich Selektivität und Nebenwirkungsprofil (191).

Für die Target-Identifizierung stehen im Wesentlichen entweder direkte biochemische Methoden, genetische Manipulationen oder die computergestützte Inferenz zur Verfügung. Oftmals ist es notwendig diese Ansätze zu kombinieren, um in Folge dessen sämtliche off- und on-Target Effekte der Testsubstanzen entschlüsseln zu können. Bei der direkten Methode findet üblicherweise eine Markierung der Testsubstanz oder des Proteins statt, welche anschließend miteinander inkubiert und auf Interaktionen hin untersucht werden (192). Bei der genetischen Manipulation wird das vermutete Zielprotein durch molekulargenetische Verfahren modifiziert und die veränderte Bindungscharakteristik der Testsubstanz untersucht (193). Die computergestützte Inferenz hingegen generiert Target-Hypothesen, die auf Ähnlichkeiten zwischen den Effekten der Testsubstanz mit bekannten Referenzmolekülen beziehungsweise genetischen Besonderheiten der Erkrankung beruhen (194, 195). Als Ergebnis dieser verschiedenen Untersuchungsmethoden erlangt man jedoch eher eine mechanistische Hypothese, als dass das Target per se identifiziert werden kann. Das so abgeleitete Zielprotein oder der Signalweg muss deshalb noch weitergehend verifiziert werden (196). Diese Möglichkeit stand uns je-

doch nicht zur Verfügung, weswegen die Target-Identifizierung in dem hier beschriebenen Projekt bisher nicht durchgeführt worden ist.

4.5 Tetrahydrocarbazole

Die erste Beschreibung von Carbazolen und deren Isolierung aus Steinkohleteer erfolgte bereits 1872 durch Graebe und Glazer (197). Carbazole weisen eine breite biologische Aktivität auf. Beschrieben worden sind zum Beispiel antimikrobielle und antiinflammatorische Eigenschaften (198). Carvedilol, ein Betablocker mit Carbazolgrundgerüst, ist in Deutschland für die Therapie der essentiellen Hypertonie und Angina pectoris zugelassen (199). Erst kürzlich konnte für ein weiteres Carbazol (P7C3) eine proneurogene Aktivität vermittelt durch das Verhindern der Apoptose neugeborener Neuronen nachgewiesen werden (200). In der Literatur sind auch vereinzelt biologische Aktivitäten von Tetrahydrocarbazolen beschrieben, wie zum Beispiel eine mögliche Anwendung bei Schizophrenie (201) oder gegen humane Papillomaviren (202), jedoch keine Anwendung bei neurodegenerativen Erkrankungen. Die im Folgenden beschriebenen Tetrahydrocarbazolamine besitzen eine multifaktorielle Wirkweise in verschiedenen Alzheimer-relevanten Testsystemen.

4.5.1 Modulation der Freisetzung von Kalzium aus dem ER

Die Störung der neuronalen Kalziumhomöostase bei Morbus Alzheimer geht der Entwicklung klinischer Symptome um Jahre voraus (52–54), und stellt eine wichtige Ursache sowohl für die Bildung von A β - bzw. Tau Aggregaten (203), als auch für Schäden an der Synapse dar (185). Altersbedingte Veränderungen der neuronalen Kalziumhomöostase werden, wie Störungen der mitochondrialen Funktion als mögliche Ursache des normalen Alterungsprozesses, dem Hauptrisikofaktor für Morbus Alzheimer, angesehen (204). Auf Grund der vielfältigen zellulären Funktionen von im ER gespeicherten Kalzium auf die Pathogenese des Morbus Alzheimer erscheint es wahrscheinlich, dass bereits eine geringe Modulation der Kalziummenge, die bei Leerung intrazellulärer Speicher freigesetzt wird, langfristige therapeutische Effekte haben kann (205). In der Tat konnte in Alzheimer Mausmodellen gezeigt werden, dass eine pharmakologische Beeinflussung der Kalziumhomöostase durch Hemmung des Ryanodin-Rezeptors mit Dantrolen zu einer Normalisierung der synaptischen Übertragung und Plastizität, einer

Verringerung der Menge an A β -Peptiden und einer Verbesserung der kognitiven Funktionen führt (206, 207).

Die Entwicklung spezifischer pharmazeutischer Behandlungsstrategien, die einen langfristigen Effekt auf die Speicherung und Freisetzung von Kalzium aus intrazellulären Speichern haben, erscheint daher wichtiger denn je. Mit Hilfe des hier beschriebenen High-Throughput-Screenings war es möglich Substanzen zu identifizieren, die hier ansetzten. So sind die im Rahmen dieser Arbeit identifizierten Tetrahydrocarbazolamine in der Lage die nach Applikation von Carbachol pathologisch erhöhten zytosolischen Kalziumspiegel auf ein physiologisches Maß abzusenken.

4.5.2 Modulation des mitochondrialen Membranpotentials

Neben der Fähigkeit erhöhte Kalziumspiegel zu normalisieren sind Tetrahydrocarbazolamine auch in der Lage das mitochondriale Membranpotential positiv zu beeinflussen. Das mitochondriale Membranpotential korreliert direkt mit der Funktion der ATP-Synthase und damit der Energiebereitstellung der Zelle (126). Mitochondrienvermittelter oxidativer Stress, gestörter Kalziumhaushalt und der apoptotische Zelltod gelten als zentrale pathophysiologische Mechanismen bei neurodegenerativen Erkrankungen wie dem Morbus Alzheimer, dem Morbus Parkinson und Chorea Huntington (208). In der Tat konnte gezeigt werden, dass bei Morbus Alzheimer die mitochondriale Funktion beeinträchtigt ist (209). Pathologische Veränderungen der Kalziumhomöostase führen ebenfalls zu einer Störung der mitochondrialen Energieproduktion, sowie zu einer verstärkten A β -Peptid Bildung (56). Insgesamt wird die gestörte Aktivität von Mitochondrien als ein frühes Ereignis in der Pathogenese des Morbus Alzheimer angesehen und stellt damit einen möglichen Angriffspunkt für potentielle Wirkstoffe dar. Einige Wirkstoffe, die einen direkten Einfluss auf die Funktion der Mitochondrien besitzen wurden demzufolge auf ihre therapeutische Wirksamkeit bei Morbus Alzheimer hin untersucht. Hierzu zählen Substanzen wie Dimebon, Methylenblau, Piracetam, der standardisierte Extrakt aus *Ginkgo biloba* (EGb761[®]) und Simvastatin. Obwohl der genaue Wirkmechanismus bis zum jetzigen Zeitpunkt nicht vollends verstanden ist, konnten für diese Substanzen durchaus positive Effekte in präklinischen Untersuchungen gezeigt werden (210). So konnte nachgewiesen werden, dass Dimebon in der Lage ist verschiedene Parameter der mitochondrialen Funktion, wie zum Beispiel das mitochondriale Membranpotential, die Produktion von ATP oder apoptotische Vorgänge in

humanen Neuroblastomazellen (SH-SY5Y) und in kortikalen Neuronen von Ratten positiv zu beeinflussen (156). In daraufhin durchgeführten klinischen Studien blieben die erhofften Effekte auf die Gedächtnisleistung und die Alltagskompetenzen jedoch aus (155). Dennoch bleibt die Verbesserung der Energiebereitstellung der Zelle weiterhin ein wichtiger Ansatz in der Therapie des Morbus Alzheimer. Auf Grund seiner Wirkung auf das mitochondriale Membranpotential (156) wurde Dimebon als Referenzsubstanz bei der Untersuchung der Effekte der Tetrahydrocarbazolamine verwendet. Die potentesten Vertreter der Tetrahydrocarbazolamine sind in der Lage das mitochondriale Membranpotential bis um den Faktor 3 gegenüber Kontrollbedingungen und den Faktor 2 gegenüber Dimebon zu erhöhen.

4.5.3 Modulation von A β -Peptid Spiegeln

Nach heutigen Kenntnissen stellt die Akkumulation von A β -Peptiden einen der zentralen pathologischen Mechanismen des Morbus Alzheimer dar. Moleküle, die in der Lage sind A β -Peptid-Konzentrationen zu reduzieren nehmen deshalb eine zentrale Stellung in der ursachenorientierten Wirkstoffsuche ein. Die Strukturklasse der Tetrahydrocarbazolamine ist in der Lage mit der Normalisierung der Freisetzung von Kalzium aus dem ER genau einen solchen frühen Vorgang zu adressieren. Gleichzeitig, oder als Folge davon verringern Tetrahydrocarbazolamine die Konzentration von A β -Peptiden unterschiedlicher Länge. Da erhöhte Kalziumspiegel die Aktivität der β -Sekretase verstärken können (157), könnte der Effekt der Tetrahydrocarbazolamine auf die Konzentration von A β -Peptiden Folge der Normalisierung des Kalziumhaushaltes der Zelle sein. In der Tat konnten wir erniedrigte Spiegel von APPs β und somit eine verminderte Aktivität der β -Sekretase nach Behandlung von Zellen mit Tetrahydrocarbazolaminen messen (120).

4.5.4 Versuche in vivo

Toxizität und Wirkstoffapplikation

Ein wichtiges Kapitel in der präklinischen Forschung ist die Abschätzung der Toxizität eines Wirkstoffes. Ziel ist es, das Gefährdungspotential einer Substanz vor dem Einsatz in klinischen Studien möglichst gut zu beschreiben bzw. zu verstehen. Theoretische Modelle zur Abschätzung der Toxizität mit einer ausreichenden Zuverlässigkeit gibt es

bis heute noch nicht. Daher ist hier der Tierversuch unumgänglich. Routine ist die Bestimmung der akuten und chronischen Toxizität in mindestens zwei verschiedenen Tierarten. Aktuelle Richtlinien für die offizielle Vorgehensweise werden von der OECD herausgegeben. Diese Anweisungen ermöglichen eine möglichst genaue Vorhersage der Toxizität bei einer gleichzeitig möglichst geringen Anzahl verwendeter Versuchstiere (133). Bei den Versuchen zur akuten Toxizität zeigten sich die beiden untersuchten Tetrahydrocarbazolamine gea_97 und gea_133 als äußerst gut verträglich. Die LD₅₀-Werte befinden sich im Bereich gängiger, freiverkäuflicher Arzneimittel (158). Die chronische Toxizität sollte im Rahmen des Therapieversuches untersucht werden. Die hier beobachteten toxischen Effekte traten auch nach einer Reduzierung der ursprünglichen Dosis weiterhin auf. Da bei der Untersuchung der akuten Toxizität keine Anzeichen toxischer Effekte auftraten, wäre es möglich, dass bei wiederholter Gabe eine sehr geringe Toxizität von gea_133 zu einer schleichenden Vergiftung führt. Eine weitere Möglichkeit wäre, dass durch Metabolisierungsreaktionen in der Leber das Molekül so umgewandelt wird, dass sich dort toxische Metabolite anreichern, die für die von uns beobachtete Nekrose möglicherweise verantwortlich sind. Die genauen Mechanismen, auf welche Art und Weise die in der vorliegenden Arbeit untersuchten Tetrahydrocarbazolamine metabolisiert werden, sind nicht bekannt. Die stark unterschiedlichen Wirkstoffspiegel im Gehirn nach enteraler bzw. parenteraler Verabreichung lassen sich möglicherweise mit einem ausgeprägten First-Pass-Effekt erklären. Die Untersuchung der Metabolisierungswege, der Metabolite und ihrer Toxizität ist daher für die weitere Entwicklung von Tetrahydrocarbazolaminen als Wirkstoffe in der Therapie des Morbus Alzheimer notwendig.

Die Identifizierung der idealen Verabreichungsform eines Wirkstoffes für die anschließende Therapiestudie ist von zentraler Bedeutung. Ziel ist es ein möglichst schonendes Verfahren zu wählen, bei dem gleichzeitig eine sichere und reproduzierbare Wirkstoffaufnahme gewährleistet ist. Gerade bei chronisch progressiv fortschreitenden Krankheiten wie dem Morbus Alzheimer ist eine Untersuchung über einen längeren Zeitraum erforderlich. Umso wichtiger ist es, die Belastung der Tiere durch die Wirkstoffapplikation möglichst gering zu halten. Wird ein Arzneistoff über die Nahrung oder das Trinkwasser aufgenommen stellt dies mit Sicherheit eine der schonendsten Formen der Wirkstoffapplikation dar (135). Dies scheiterte jedoch in der vorliegenden Studie daran, dass die Tiere nicht bereit waren den in Erdnussbutter oder Gelatine gelösten Wirkstoff auf-

zunehmen. Die Ursache liegt vermutlich darin begründet, dass der Wirkstoff entweder zu einer lokalen Reizung zum Beispiel der Schleimhäute führt oder von unangenehmen Geschmack ist. Generell stehen solche Probleme nicht zwingend einer oralen Verabreichung eines Wirkstoffes entgegen. So gibt es Verfahren wie die Mikroverkapselung des Wirkstoffes oder die Einarbeitung in Futterpellets (211, 212). Diese Verfahren sind jedoch sehr aufwändig und kostenintensiv und nur dann sinnvoll, wenn sichergestellt ist, dass eine enterale und parenterale Verabreichung zu entsprechenden Wirkstoffspiegeln in Blut und Gehirn der Versuchstiere führt. Auf Grund der unterschiedlichen Wirkstoffspiegel in Blut und Gehirn bei enteraler und parenteraler Verabreichung wurden diese Methoden jedoch nicht weiter in Betracht gezogen, sondern stattdessen nach Applikationsarten vornehmlich auf parenteralem Wege gesucht. Hier ergab nur die intraperitoneale Applikation ausreichende Wirkstoffspiegel in Blut und Gehirn der Versuchstiere, weshalb diese für die anschließenden Therapieversuche ausgewählt wurde.

Therapiestudie

Verschiedene transgene Mausmodelle, die Mutationen in APP und/oder den Präsenilinen tragen, und somit vermehrt A β -Peptide produzieren, die sich zu Plaques ablagern, stehen der Forschung zur Testung möglicher Wirkstoffe zur Verfügung (213). Nachdem der Effekt von Tetrahydrocarbazolaminen auf die Verringerung von A β -Peptid Spiegeln *in vitro* gezeigt werden konnte (vgl. Kapitel 3.2.3, Seite 80), sollte zusätzlich der Effekt einer dieser Substanzen (gea_133) auf die Plaquegröße und -dichte der transgenen Mausmodelle APPPS1 Δ E9 (140) und APPPS1 (143) untersucht werden.

Die bei chronischer Applikation auftretende Toxizität von gea_133 machte es unmöglich, den Therapieversuch über die ursprünglich geplante Dauer durchzuführen. In der daraus resultierenden kurzen Behandlungsdauer von 17 Tagen konnte kein signifikanter Einfluss von gea_133 auf die Größe bzw. Dichte von Plaques gemessen werden. Dieses Ergebnis muss jedoch nicht zwangsläufig für die gesamte Strukturklasse der Tetrahydrocarbazolamine zutreffen.

4.5.5 Fazit

Festzuhalten bleibt, dass Tetrahydrocarbazolamine in der Lage sind drei zentrale pathophysiologische Vorgänge in der Pathogenese des Morbus Alzheimer zu adressieren. So konnte in Zellkulturversuchen gezeigt werden, dass

1. die durch Expression von mutiertem PS1 gestörte Kalziumhomöostase normalisiert wird,
2. die Aktivität der Mitochondrien verbessert und
3. die Spiegel von toxischen A β -Peptiden reduziert werden.

In den daraufhin durchgeführten Tierversuchen blieben die zu erwartenden Effekte auf die Größe und Dichte von Amyloid-Plaques jedoch aus.

Dieses ist möglicherweise durch die problematischen pharmakokinetischen Eigenschaften der Substanzklasse bedingt. So wurde beobachtet, dass relativ hohe Dosen notwendig waren, um therapeutische Spiegel in Blut und Gehirn zu erreichen. Diese hohen Dosen sind vermutlich die Ursache der im Therapieversuch beobachteten hohen Letalität von gea_133, auf Grund dessen die Tiere nur über einen relativ kurzen Zeitraum behandelt werden konnten. Bei der histologischen Untersuchung der inneren Organe der unter der Therapie verstorbenen Versuchstiere wurden Lebernekrosen beobachtet. Eine Lebertoxizität einer neuen Wirkstoffklasse ist nicht ungewöhnlich und eine Prüfung darauf wird in der industriellen Wirkstoffforschung häufig direkt im Anschluss an die *in vitro* Identifizierung eines Wirkstoffs durch Versuche an menschlichen Leberzellkulturen (HepG2) durchgeführt. Diese Möglichkeit stand uns jedoch nicht zur Verfügung.

Eine Lebertoxizität muss jedoch nicht bedeuten, dass eine Stoffklasse generell ungeeignet ist. Durch eine Dosisreduktion mit Hilfe von neuen Strukturanaloga, die eine größere Aktivität besitzen, oder der Identifizierung weniger toxischer Vertreter aus der gleichen Stoffklasse wäre es theoretisch möglich einen solchen Wirkstoff dennoch weiter zu entwickeln.

5 Zusammenfassung

Ziel der vorliegenden Arbeit war es, einen neuen Wirkstoff für die Therapie des Morbus Alzheimer zu entwickeln. Morbus Alzheimer ist die häufigste Demenzerkrankung in Deutschland (1). Charakteristisch für diese neurodegenerative Erkrankung ist die zunehmende Verschlechterung der kognitiven Leistungsfähigkeit, die mit einem Untergang von Nervenzellen und Synapsen einhergeht. Für die neuropathologische Diagnose des Morbus Alzheimer ist der Nachweis von extrazellulären A β -Plaques und intrazellulären versilberbaren Strukturen, den sogenannten neurofibrillären Bündeln (tangles) entscheidend (5).

Die Enzyme, die zu der Bildung dieser Aggregate, die im Wesentlichen aus fehlgefalteten körpereigenen Proteinen, dem β -Amyloid bzw. dem Tau-Protein bestehen, beitragen, sind die primären Zielmoleküle in der Wirkstoffentwicklung auf diesem Gebiet in den letzten 20 Jahren gewesen. So wurde eine große Zahl von Wirkstoffen bzw. therapeutischen Ansätzen identifiziert, die effektiv *in vitro* und *in vivo* die Bildung dieser Aggregate inhibieren (1). Die erhofften Effekte auf die alters- und amyloid-abhängigen Defizite bei der Lern- und Gedächtnisleistung konnten durch klinische Studien jedoch nicht belegt werden (73). Eine mögliche Erklärung für den Misserfolg dieser sehr aufwändigen Studien ist, dass Veränderungen durch Ablagerungen von fibrillärem A β bzw. Tau zu irreversiblen Schädigungen führen und somit eine ausschließlich auf A β - bzw. Tau fokussierte Therapie nach Ausbruch der Krankheit möglicherweise nicht ausreichend ist.

Mit den in der Arbeitsgruppe etablierten zellbasierten Assays ist es möglich, Wirkstoffe zu identifizieren, die die Störung der Speicherung von Kalzium im endoplasmatischen Retikulum (ER), einen pathophysiologisch relevanten Mechanismus der Pathogenese des Morbus Alzheimer, modulieren (120). Dieser Ansatz verfolgt somit nicht die seit Jahren praktizierte Strategie, die A β - bzw. Tau-Aggregation direkt zu hemmen, sondern der für die Akkumulation dieser Proteine ursächlichen Schädigung von Nervenzellen und deren synaptischen Kontakten entgegenzuwirken. Ziel war es, innovative Wirkstoffe zu entwickeln, die Störungen der zytosolischen Kalziumkonzentration bzw. der Kalziumfreisetzung aus dem ER in einer frühen Phase der neuronalen Schädigung normalisieren. Optimierte Vertreter der neu entdeckten Strukturklasse der Tetrahydrocarbazolamine stabilisieren in der Tat die Kalziumfreisetzung aus dem ER,

verbessern den Energiehaushalt der Zelle und verringern die Bildung toxischer A β -Peptide. Der genaue Wirkmechanismus der Tetrahydrocarbazolamine konnte in dieser Arbeit jedoch nicht entschlüsselt werden und wird Gegenstand zukünftiger Forschungsprojekte sein müssen. Als mögliches Target bieten sich zum Beispiel IP₃-Rezeptoren an. Eine mögliche Interaktion mit diesen könnte dazu führen, dass weniger Kalzium aus dem endoplasmatischen Retikulum in das Zytosol austritt. Die identifizierten Verbindungen haben zusätzlich einen positiven Effekt auf die Aktivität der Mitochondrien, was wiederum zu einer Steigerung der Energiebereitstellung der Zelle führt und einen Effekt auf die Produktion von A β -Peptiden hat (56). Auch Kalzium beeinflusst über eine indirekte Hemmung der β -Sekretase die Menge an gebildetem A β (157). In Folge dessen wirken Tetrahydrocarbazolamine sehr wahrscheinlich über verschiedene Mechanismen auf die Bildung der toxischen A β -Peptide. Eine synergistische Verstärkung ist daher durchaus denkbar. Tetrahydrocarbazolamine besitzen somit eine Wirkung auf drei verschiedene Mechanismen, die bereits zu Beginn der Pathogenese von Morbus Alzheimer eine wichtige Rolle spielen. Zurzeit befinden sich nach den uns zugänglichen Informationen keine anderen Substanzen in der präklinischen oder klinischen Entwicklung, die ein ähnlich breites Wirkprofil aufweisen.

In den anschließend durchgeführten Therapieversuchen in transgenen Mausmodellen des Morbus Alzheimer konnte allerdings kein Effekt auf die Anzahl und Größe von Plaques festgestellt werden. Dies ist vermutlich vor allem der kurzen Behandlungsdauer zuzuschreiben. Eine längere Behandlung mit gea_133 war auf Grund einer Lebertoxizität, die wahrscheinlich ursächlich für das Sterben der Tiere in der 3. Behandlungswoche war, nicht möglich. Ein zentraler Punkt der zukünftigen Erforschung dieser Substanzklasse wird die Entwicklung und Testung von Derivaten sein, die keine Lebertoxizität aufweisen.

6 Literatur

1. H. Brody, M. Grayson, T. Scully, A. Macdonald, K. Smart, S. Russell, G. Preston, Y. Smith, E. Woodstock, H. Phipps, H. Anthony, P. Campbell, Nature outlook: Alzheimer's disease, *Nature* **475**, S01–S22 (2011).
2. U. Ziegler, G. Doblhammer, Prevalence and incidence of dementia in Germany-a study based on data from the public sick funds in 2002., *Gesundheitswesen (Bundesverband der Ärzte des Öffentlichen Gesundheitsdienstes (Germany))* **71**, 281–90 (2009).
3. K. Böhm, S. Mardorf, M. Nöthen, S. T, E. Hoffmann, A. Hokema, S. Menning, B. Schüz, D. Sulmann, C. Tesch-Römer, S. Wurm, L. Kroll, T. Lampert, S. List, L. Ryl, A. Saß, T. Ziese, in *Beiträge zur Gesundheitsberichterstattung des Bundes*, (Robert Koch Institut, 2009), p. 320.
4. C. Qiu, D. De Ronchi, L. Fratiglioni, The epidemiology of the dementias: an update., *Current Opinion in Psychiatry* **20**, 380–5 (2007).
5. A. Alzheimer, Über eine eigenartige Erkrankung der Hirnrinde, *Allgemeine Zeitschrift für Psychiatrie und Psychisch-gerichtliche Medizin* , 146–8 (1907).
6. G. Cipriani, C. Dolciotti, L. Picchi, U. Bonuccelli, Alzheimer and his disease: a brief history., *Neurological Science* **32**, 275–9 (2011).
7. A. Alzheimer, *Krankenblatt Auguste Deter*, (1901).
8. E. Kraepelin, in *Psychiatrie: Ein Lehrbuch für Studierende und Ärzte*, (Barth, Leipzig, 1910), pp. 593–632.
9. A. Hofman, W. a Rocca, C. Brayne, M. M. Breteler, M. Clarke, B. Cooper, J. R. Copeland, J. F. Dartigues, A. da Silva Droux, O. Hagnell, The prevalence of dementia in Europe: a collaborative study of 1980-1990 findings. Eurodem Prevalence Research Group., *International Journal of Epidemiology* **20**, 736–48 (1991).
10. K. Andersen, L. J. Launer, M. E. Dewey, L. Letenneur, A. Ott, J. R. Copeland, J. F. Dartigues, P. Kragh-Sorensen, M. Baldereschi, C. Brayne, A. Lobo, J. M. Martinez-Lage, T. Stijnen, A. Hofman, Gender differences in the incidence of AD and vascular dementia: The EURODEM Studies. EURODEM Incidence Research Group., *Neurology* **53**, 1992–7 (1999).

11. R. E. Tanzi, The genetics of Alzheimer disease., *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine* **2** (2012), doi:10.1101/cshperspect.a006296.
12. C. Haass, D. J. Selkoe, Cellular processing of beta-amyloid precursor protein and the genesis of amyloid beta-peptide., *Cell* **75**, 1039–42 (1993).
13. D. J. Selkoe, Physiological production of the beta-amyloid protein and the mechanism of Alzheimer's disease., *Trends in Neurosciences* **16**, 403–9 (1993).
14. D. M. Holtzman, J. C. Morris, A. M. Goate, Alzheimer's disease: the challenge of the second century., *Science Translational Medicine* **3**, 77sr1 (2011).
15. S. Karantzoulis, J. E. Galvin, Distinguishing Alzheimer's disease from other major forms of dementia., *Expert Review of Neurotherapeutics* **11**, 1579–91 (2011).
16. A. Serrano-Pozo, M. P. Frosch, E. Masliah, B. T. Hyman, Neuropathological alterations in Alzheimer disease., *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine* **1**, a006189 (2011).
17. G. G. Glenner, C. W. Wong, Alzheimer's disease: initial report of the purification and characterization of a novel cerebrovascular amyloid protein., *Biochemical and Biophysical Research Communications* **120**, 885–90 (1984).
18. J. Kang, H. G. Lemaire, A. Unterbeck, J. M. Salbaum, C. L. Masters, K. H. Grzeschik, G. Multhaup, K. Beyreuther, B. Müller-Hill, The precursor of Alzheimer's disease amyloid A4 protein resembles a cell-surface receptor., *Nature* **325**, 733–6 (1987).
19. E. Masliah, R. D. Terry, M. Mallory, M. Alford, L. A. Hansen, Diffuse plaques do not accentuate synapse loss in Alzheimer's disease., *The American Journal of Pathology* **137**, 1293–7 (1990).
20. B. Urbanc, L. Cruz, R. Le, J. Sanders, K. H. Ashe, K. Duff, H. E. Stanley, M. C. Irizarry, B. T. Hyman, Neurotoxic effects of thioflavin S-positive amyloid deposits in transgenic mice and Alzheimer's disease., *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **99**, 13990–5 (2002).
21. T. L. Spires-Jones, W. H. Stoothoff, A. de Calignon, P. B. Jones, B. T. Hyman, Tau pathophysiology in neurodegeneration: a tangled issue., *Trends in Neurosciences* **32**, 150–9 (2009).

22. M. Goedert, R. Jakes, Mutations causing neurodegenerative tauopathies., *Biochimica et Biophysica Acta* **1739**, 240–50 (2005).
23. H. Braak, E. Braak, Neuropathological staging of Alzheimer-related changes., *Acta Neuropathologica* **82**, 239–59 (1991).
24. W. J. Hoogendijk, C. W. Pool, D. Troost, E. van Zwieten, D. F. Swaab, Image analyser-assisted morphometry of the locus coeruleus in Alzheimer's disease, Parkinson's disease and amyotrophic lateral sclerosis., *Brain* **118**, 131–43 (1995).
25. M. J. West, P. D. Coleman, D. G. Flood, J. C. Troncoso, Differences in the pattern of hippocampal neuronal loss in normal ageing and Alzheimer's disease., *Lancet* **344**, 769–72 (1994).
26. H. Lassmann, Patterns of synaptic and nerve cell pathology in Alzheimer's disease., *Behavioural Brain Research* **78**, 9–14 (1996).
27. D. H. Small, S. S. Mok, J. C. Bornstein, Alzheimer's disease and Abeta toxicity: from top to bottom., *Nature Reviews. Neuroscience* **2**, 595–8 (2001).
28. B. T. Hyman, G. W. Van Hoesen, A. R. Damasio, C. L. Barnes, Alzheimer's disease: cell-specific pathology isolates the hippocampal formation., *Science (New York, N.Y.)* **225**, 1168–70 (1984).
29. D. Goldgaber, M. I. Lerman, O. W. McBride, U. Saffiotti, D. C. Gajdusek, Characterization and chromosomal localization of a cDNA encoding brain amyloid of Alzheimer's disease., *Science (New York, N.Y.)* **235**, 877–80 (1987).
30. R. E. Tanzi, J. F. Gusella, P. C. Watkins, G. A. Bruns, P. St George-Hyslop, M. L. Van Keuren, D. Patterson, S. Pagan, D. M. Kurnit, R. L. Neve, Amyloid beta protein gene: cDNA, mRNA distribution, and genetic linkage near the Alzheimer locus., *Science (New York, N.Y.)* **235**, 880–4 (1987).
31. S. Ness, M. Rafii, P. Aisen, M. Krams, W. Silverman, H. Manji, Down's syndrome and Alzheimer's disease: towards secondary prevention., *Nature Reviews. Drug Discovery* **11**, 655–6 (2012).
32. F. Kamenetz, T. Tomita, H. Hsieh, G. Seabrook, D. Borchelt, T. Iwatsubo, S. Sisodia, R. Malinow, APP processing and synaptic function., *Neuron* **37**, 925–37 (2003).

33. W. T. Kimberly, M. J. LaVoie, B. L. Ostaszewski, W. Ye, M. S. Wolfe, D. J. Selkoe, Gamma-secretase is a membrane protein complex comprised of presenilin, nicastrin, Aph-1, and Pen-2., *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **100**, 6382–7 (2003).
34. B. E. Needham, M. E. Wlodek, G. D. Ciccotosto, B. C. Fam, C. L. Masters, J. Proietto, S. Andrikopoulos, R. Cappai, Identification of the Alzheimer's disease amyloid precursor protein (APP) and its homologue APLP2 as essential modulators of glucose and insulin homeostasis and growth., *The Journal of Pathology* **215**, 155–63 (2008).
35. S. Eggert, K. Paliga, P. Soba, G. Evin, C. L. Masters, A. Weidemann, K. Beyreuther, The proteolytic processing of the amyloid precursor protein gene family members APLP-1 and APLP-2 involves alpha-, beta-, gamma-, and epsilon-like cleavages: modulation of APLP-1 processing by n-glycosylation., *The Journal of Biological Chemistry* **279**, 18146–56 (2004).
36. K. Irie, K. Murakami, Y. Masuda, A. Morimoto, H. Ohgashi, R. Ohashi, K. Takegoshi, M. Nagao, T. Shimizu, T. Shirasawa, Structure of beta-amyloid fibrils and its relevance to their neurotoxicity: implications for the pathogenesis of Alzheimer's disease., *Journal of Bioscience and Bioengineering* **99**, 437–47 (2005).
37. B. De Strooper, P. Saftig, K. Craessaerts, H. Vanderstichele, G. Guhde, W. Annaert, K. Von Figura, F. Van Leuven, Deficiency of presenilin-1 inhibits the normal cleavage of amyloid precursor protein., *Nature* **391**, 387–90 (1998).
38. B. De Strooper, W. Annaert, P. Cupers, P. Saftig, K. Craessaerts, J. S. Mumm, E. H. Schroeter, V. Schrijvers, M. S. Wolfe, W. J. Ray, A. Goate, R. Kopan, A presenilin-1-dependent gamma-secretase-like protease mediates release of Notch intracellular domain., *Nature* **398**, 518–22 (1999).
39. M. S. Wolfe, W. Xia, B. L. Ostaszewski, T. S. Diehl, W. T. Kimberly, D. J. Selkoe, Two transmembrane aspartates in presenilin-1 required for presenilin endoproteolysis and gamma-secretase activity., *Nature* **398**, 513–7 (1999).
40. H. Laudon, E. M. Hansson, K. Melén, A. Bergman, M. R. Farmery, B. Winblad, U. Lendahl, G. von Heijne, J. Näslund, A nine-transmembrane domain topology for presenilin 1., *The Journal of Biological Chemistry* **280**, 35352–60 (2005).

41. K. Honarnejad, J. Herms, Presenilins: role in calcium homeostasis., *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology* **44**, 1983–6 (2012).
42. R. Sherrington, E. I. Rogaev, Y. Liang, E. A. Rogaeva, G. Levesque, M. Ikeda, H. Chi, C. Lin, G. Li, K. Holman, T. Tsuda, L. Mar, J. F. Foncin, A. C. Bruni, M. P. Montesi, S. Sorbi, I. Rainero, L. Pinessi, L. Nee, I. Chumakov, D. Pollen, A. Brookes, P. Sanseau, R. J. Polinsky, W. Wasco, H. A. Da Silva, J. L. Haines, M. A. Pericak-Vance, R. E. Tanzi, A. D. Roses, P. E. Fraser, J. M. Rommens, P. H. St George-Hyslop, Cloning of a gene bearing missense mutations in early-onset familial Alzheimer's disease., *Nature* **375**, 754–60 (1995).
43. E. Levy-Lahad, W. Wasco, P. Poorkaj, D. M. Romano, J. Oshima, W. H. Pettingell, C. E. Yu, P. D. Jondro, S. D. Schmidt, K. Wang, Candidate gene for the chromosome 1 familial Alzheimer's disease locus., *Science (New York, N.Y.)* **269**, 973–7 (1995).
44. C. Haass, C. Kaether, G. Thinakaran, S. Sisodia, Trafficking and Proteolytic Processing of APP., *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine* **2** (2012), doi:10.1101/cshperspect.a006270.
45. M. L. Hemming, J. E. Elias, S. P. Gygi, D. J. Selkoe, Proteomic profiling of gamma-secretase substrates and mapping of substrate requirements., *PLoS biology* **6**, e257 (2008).
46. D. Levitan, I. Greenwald, Facilitation of lin-12-mediated signalling by sel-12, a *Caenorhabditis elegans* S182 Alzheimer's disease gene., *Nature* **377**, 351–4 (1995).
47. I. Greenwald, LIN-12/Notch signaling: lessons from worms and flies., *Genes & Development* **12**, 1751–62 (1998).
48. G. H. Searfoss, W. H. Jordan, D. O. Calligaro, E. J. Galbreath, L. M. Schirtzinger, B. R. Berridge, H. Gao, M. a Higgins, P. C. May, T. P. Ryan, Adipsin, a biomarker of gastrointestinal toxicity mediated by a functional gamma-secretase inhibitor., *The Journal of Biological Chemistry* **278**, 46107–16 (2003).
49. D. Schenk, G. S. Basi, M. N. Pangalos, Treatment Strategies Targeting Amyloid β -Protein., *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine* (2012), doi:10.1101/cshperspect.a006387.

50. B. De Strooper, T. Iwatsubo, M. S. Wolfe, Presenilins and γ -Secretase: Structure, Function, and Role in Alzheimer Disease., *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine* (2012), doi:10.1101/cshperspect.a006304.
51. M. P. Mattson, Calcium as sculptor and destroyer of neural circuitry., *Experimental Gerontology* **27**, 29–49 (1992).
52. M. P. Mattson, S. L. Chan, Dysregulation of cellular calcium homeostasis in Alzheimer's disease: bad genes and bad habits., *Journal of Molecular Neuroscience* **17**, 205–24 (2001).
53. M. P. Mattson, Calcium and neurodegeneration., *Aging Cell* **6**, 337–50 (2007).
54. G. Zündorf, G. Reiser, Calcium dysregulation and homeostasis of neural calcium in the molecular mechanisms of neurodegenerative diseases provide multiple targets for neuroprotection., *Antioxidants & Redox Signaling* **14**, 1275–88 (2011).
55. H. W. Querfurth, D. J. Selkoe, Calcium ionophore increases amyloid beta peptide production by cultured cells., *Biochemistry* **33**, 4550–61 (1994).
56. C. Supnet, I. Bezprozvanny, The dysregulation of intracellular calcium in Alzheimer disease., *Cell Calcium* **47**, 183–9 (2010).
57. F. Watt, Nuclear microscope analysis in Alzheimer's and Parkinson's disease: A review., *Cellular and Molecular Biology* **42**, 17–26 (1996).
58. I. Bezprozvanny, M. P. Mattson, Neuronal calcium mishandling and the pathogenesis of Alzheimer's disease., *Trends in Neurosciences* **31**, 454–63 (2008).
59. E. Ito, K. Oka, R. Etcheberrigaray, T. J. Nelson, D. L. McPhie, B. Tofel-Grehl, G. E. Gibson, D. L. Alkon, Internal Ca^{2+} mobilization is altered in fibroblasts from patients with Alzheimer disease., *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **91**, 534–8 (1994).
60. M. a. Leissring, B. A. Paul, I. Parker, C. W. Cotman, F. M. Laferla, Alzheimer's Presenilin-1 Mutation Potentiates Inositol 1,4,5-Trisphosphate-Mediated Calcium Signaling in *Xenopus*, *Journal of Neurochemistry* **72**, 1061 (1999).
61. S. L. Chan, M. Mayne, C. P. Holden, J. D. Geiger, M. P. Mattson, Presenilin-1 mutations increase levels of ryanodine receptors and calcium release in PC12 cells and cortical neurons., *The Journal of Biological Chemistry* **275**, 18195–200 (2000).

62. I. Schneider, D. Reverse, I. Dewachter, L. Ris, N. Caluwaerts, C. Kuiperi, M. Gilis, H. Geerts, H. A. Kretzschmar, E. Godaux, D. Moechars, F. Van Leuven, J. Herms, Mutant presenilins disturb neuronal calcium homeostasis in the brain of transgenic mice, decreasing the threshold for excitotoxicity and facilitating long-term potentiation., *The Journal of Biological Chemistry* **276**, 11539–44 (2001).
63. G. E. Stutzmann, A. Caccamo, F. M. Laferla, I. Parker, Dysregulated IP3 signaling in cortical neurons of knock-in mice expressing an Alzheimer's-linked mutation in presenilin1 results in exaggerated Ca²⁺ signals and altered membrane excitability., *The Journal of Neuroscience* **24**, 508–13 (2004).
64. H. Tu, O. Nelson, A. Bezprozvanny, Z. Wang, S.-F. Lee, Y.-H. Hao, L. Serneels, B. De Strooper, G. Yu, I. Bezprozvanny, Presenilins form ER Ca²⁺ leak channels, a function disrupted by familial Alzheimer's disease-linked mutations., *Cell* **126**, 981–93 (2006).
65. K.-H. Cheung, D. Shineman, M. Müller, C. Cárdenas, L. Mei, J. Yang, T. Tomita, T. Iwatsubo, V. M.-Y. Lee, J. K. Foskett, Mechanism of Ca²⁺ disruption in Alzheimer's disease by presenilin regulation of InsP3 receptor channel gating., *Neuron* **58**, 871–83 (2008).
66. G. Kroemer, L. Galluzzi, C. Brenner, Mitochondrial membrane permeabilization in cell death., *Physiological Reviews* **87**, 99–163 (2007).
67. M. B. de Moura, L. S. dos Santos, B. Van Houten, Mitochondrial dysfunction in neurodegenerative diseases and cancer., *Environmental and Molecular Mutagenesis* **51**, 391–405 (2010).
68. S. J. Baloyannis, Dendritic pathology in Alzheimer's disease., *Journal of the Neurological Sciences* **283**, 153–7 (2009).
69. M. Hashimoto, E. Rockenstein, L. Crews, E. Masliah, Role of protein aggregation in mitochondrial dysfunction and neurodegeneration in Alzheimer's and Parkinson's diseases., *Neuromolecular Medicine* **4**, 21–36 (2003).
70. P. Aisen, J. Cummings, L. S. Schneider, Symptomatic and nonamyloid/tau based pharmacologic treatment for Alzheimer disease., *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine* , a006395 (2012).

71. B. Cullen, B. O'Neill, J. J. Evans, R. F. Coen, B. a Lawlor, A review of screening tests for cognitive impairment., *Journal of Neurology, Neurosurgery, and Psychiatry* **78**, 790–9 (2007).
72. IQWiG, *Cholinesterasehemmer bei Alzheimer Demenz. Abschlussbericht A05-19A*. (Institut für Qualität und Wirtschaftlichkeit im Gesundheitswesen (IQWiG), Köln, 2007).
73. F. Mangialasche, A. Solomon, B. Winblad, P. Mecocci, M. Kivipelto, Alzheimer's disease: clinical trials and drug development., *Lancet Neurology* **9**, 702–16 (2010).
74. A. Contestabile, The history of the cholinergic hypothesis., *Behavioural Brain Research* **221**, 334–40 (2011).
75. J. Birks, Cholinesterase inhibitors for Alzheimer's disease., *Cochrane Database of Systematic Reviews* (2006), doi:10.1002/14651858.CD005593.
76. H. Martinez-Coria, K. N. Green, L. M. Billings, M. Kitazawa, M. Albrecht, G. Rammes, C. G. Parsons, S. Gupta, P. Banerjee, F. M. Laferla, Memantine improves cognition and reduces Alzheimer's-like neuropathology in transgenic mice., *The American Journal of Pathology* **176**, 870–80 (2010).
77. T. Frankiewicz, C. G. Parsons, Memantine restores long term potentiation impaired by tonic N-methyl-D-aspartate (NMDA) receptor activation following reduction of Mg²⁺ in hippocampal slices., *Neuropharmacology* **38**, 1253–9 (1999).
78. T. V Bliss, G. L. Collingridge, A synaptic model of memory: long-term potentiation in the hippocampus., *Nature* **361**, 31–9 (1993).
79. IQWiG, *Memantin bei Alzheimer Demenz. Abschlussbericht A05-19C* (Institut für Qualität und Wirtschaftlichkeit im Gesundheitswesen (IQWiG), Köln, 2009).
80. G. Deuschl, W. Maier, *S3-Leitlinie "Demenzen"* (Bonn, 2009).
81. P. N. Tariot, M. R. Farlow, G. T. Grossberg, S. M. Graham, S. McDonald, I. Gergel, Memantine treatment in patients with moderate to severe Alzheimer disease already receiving donepezil: a randomized controlled trial., *The Journal of the American Medical Association* **291**, 317–24 (2004).
82. A. Eckert, Mitochondrial effects of Ginkgo biloba extract., *International Psychogeriatrics* (2012), doi:10.1017/S1041610212000531.
83. W. Dr. Schwabe GmbH & Co KG, *Fachinformation Tebonin intens 120 mg* (2012).

84. IQWiG, *Ginkgohaltige Präparate bei Alzheimer Demenz. Abschlussbericht A05-19B* (Institut für Qualität und Wirtschaftlichkeit im Gesundheitswesen (IQWiG), Köln, 2008).
85. B. Vellas, N. Coley, P.-J. Ousset, G. Berrut, J.-F. Dartigues, B. Dubois, H. Grandjean, F. Pasquier, F. Piette, P. Robert, J. Touchon, P. Garnier, H. Mathiex-Fortunet, S. Andrieu, Long-term use of standardised Ginkgo biloba extract for the prevention of Alzheimer's disease (GuidAge): a randomised placebo-controlled trial., *Lancet Neurology* **11**, 851–9 (2012).
86. H.-W. Klafki, M. Staufenbiel, J. Kornhuber, J. Wiltfang, Therapeutic approaches to Alzheimer's disease., *Brain* **129**, 2840–55 (2006).
87. H. F. Dovey, V. John, J. P. Anderson, L. Z. Chen, P. de Saint Andrieu, L. Y. Fang, S. B. Freedman, B. Folmer, E. Goldbach, E. J. Holsztyńska, K. L. Hu, K. L. Johnson-Wood, S. L. Kennedy, D. Kholodenko, J. E. Knops, L. H. Latimer, M. Lee, Z. Liao, I. M. Lieberburg, R. N. Motter, L. C. Mutter, J. Nietz, K. P. Quinn, K. L. Sacchi, P. a Seubert, G. M. Shopp, E. D. Thorsett, J. S. Tung, J. Wu, S. Yang, C. T. Yin, D. B. Schenk, P. C. May, L. D. Altstiel, M. H. Bender, L. N. Boggs, T. C. Britton, J. C. Clemens, D. L. Czilli, D. K. Dieckman-McGinty, J. J. Droste, K. S. Fuson, B. D. Gitter, P. a Hyslop, E. M. Johnstone, W. Y. Li, S. P. Little, T. E. Mabry, F. D. Miller, J. E. Audia, Functional gamma-secretase inhibitors reduce beta-amyloid peptide levels in brain., *Journal of Neurochemistry* **76**, 173–81 (2001).
88. D. Seiffert, J. D. Bradley, C. M. Rominger, D. H. Rominger, F. Yang, J. E. Meredith, Q. Wang, a H. Roach, L. a Thompson, S. M. Spitz, J. N. Higaki, S. R. Prakash, a P. Combs, R. a Copeland, S. P. Arneric, P. R. Hartig, D. W. Robertson, B. Cordell, a M. Stern, R. E. Olson, R. Zaczek, Presenilin-1 and -2 are molecular targets for gamma-secretase inhibitors., *The Journal of Biological Chemistry* **275**, 34086–91 (2000).
89. G. T. Wong, D. Manfra, F. M. Poulet, Q. Zhang, H. Josien, T. Bara, L. Engstrom, M. Pinzon-Ortiz, J. S. Fine, H.-J. J. Lee, L. Zhang, G. a Higgins, E. M. Parker, Chronic treatment with the gamma-secretase inhibitor LY-411,575 inhibits beta-amyloid peptide production and alters lymphopoiesis and intestinal cell differentiation., *The Journal of Biological Chemistry* **279**, 12876–82 (2004).

90. T. A. Lanz, M. J. Karmilowicz, K. M. Wood, N. Pozdnyakov, P. Du, M. A. Piotrowski, T. M. Brown, C. E. Nolan, K. E. G. Richter, J. E. Finley, Q. Fei, C. F. Ebbinghaus, Y. L. Chen, D. K. Spracklin, B. Tate, K. F. Geoghegan, L. Lau, D. D. Auperin, J. B. Schachter, Concentration-dependent modulation of amyloid-beta in vivo and in vitro using the gamma-secretase inhibitor, LY-450139., *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* **319**, 924–33 (2006).
91. C. Eli Lilly, Lilly Halts Development of Semagacestat for Alzheimer's Disease Based on Preliminary Results of Phase III Clinical Trials (2010).
92. W. J. Netzer, F. Dou, D. Cai, D. Veach, S. Jean, Y. Li, W. G. Bornmann, B. Clarkson, H. Xu, P. Greengard, Gleevec inhibits beta-amyloid production but not Notch cleavage., *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **100**, 12444–9 (2003).
93. S. C. Mayer, A. F. Kreft, B. Harrison, M. Abou-Gharbia, M. Antane, S. Aschmies, K. Atchison, M. Chlenov, D. C. Cole, T. Comery, G. Diamantidis, J. Ellingboe, K. Fan, R. Galante, C. Gonzales, D. M. Ho, M. E. Hoke, Y. Hu, D. Huryn, U. Jain, M. Jin, K. Kremer, D. Kubrak, M. Lin, P. Lu, R. Magolda, R. Martone, W. Moore, A. Oganessian, M. N. Pangalos, A. Porte, P. Reinhart, L. Resnick, D. R. Riddell, J. Sonnenberg-Reines, J. R. Stock, S.-C. Sun, E. Wagner, T. Wang, K. Woller, Z. Xu, M. M. Zaleska, J. Zeldis, M. Zhang, H. Zhou, J. S. Jacobsen, Discovery of begacestat, a Notch-1-sparing gamma-secretase inhibitor for the treatment of Alzheimer's disease., *Journal of Medicinal Chemistry* **51**, 7348–51 (2008).
94. K. W. Gillman, J. E. Starrett, M. F. Parker, K. Xie, J. J. Bronson, L. R. Marcin, K. E. McElhone, C. P. Bergstrom, R. a. Mate, R. Williams, J. E. Meredith, C. R. Burton, D. M. Barten, J. H. Toyn, S. B. Roberts, K. a. Lentz, J. G. Houston, R. Zaczek, C. F. Albright, C. P. Decicco, J. E. Macor, R. E. Olson, Discovery and Evaluation of BMS-708163, a Potent, Selective and Orally Bioavailable γ -Secretase Inhibitor, *ACS Medicinal Chemistry Letters* **1**, 120–124 (2010).
95. C. R. Hopkins, ACS chemical neuroscience molecule spotlight on Begacestat (GSI-953)., *ACS Chemical Neuroscience* **3**, 3–4 (2012).
96. Bristol-Myers-Squibb, Statement on Avagacestat Development Status (2012) (available at <http://www.bms.com/news/features/2012/Pages/AvagacestatDevelopmentStatus.aspx>).

97. T. Tomita, Secretase inhibitors and modulators for Alzheimer's disease treatment., *Expert Review of Neurotherapeutics* **9**, 661–79 (2009).
98. S. Weggen, J. L. Eriksen, P. Das, S. a Sagi, R. Wang, C. U. Pietrzik, K. a Findlay, T. E. Smith, M. P. Murphy, T. Bulter, D. E. Kang, N. Marquez-Sterling, T. E. Golde, E. H. Koo, A subset of NSAIDs lower amyloidogenic Abeta42 independently of cyclooxygenase activity., *Nature* **414**, 212–6 (2001).
99. D. Beher, E. E. Clarke, J. D. J. Wrigley, A. C. L. Martin, A. Nadin, I. Churcher, M. S. Shearman, Selected non-steroidal anti-inflammatory drugs and their derivatives target gamma-secretase at a novel site. Evidence for an allosteric mechanism., *The Journal of Biological Chemistry* **279**, 43419–26 (2004).
100. B. A. in t' Veld, A. Ruitenber, A. Hofman, L. J. Launer, C. M. van Duijn, T. Stijnen, M. M. Breteler, B. H. Stricker, Nonsteroidal antiinflammatory drugs and the risk of Alzheimer's disease., *The New England Journal of Medicine* **345**, 1515–21 (2001).
101. C. G. Lyketsos, J. C. S. Breitner, R. C. Green, B. K. Martin, C. Meinert, S. Piantadosi, M. Sabbagh, Naproxen and celecoxib do not prevent AD in early results from a randomized controlled trial., *Neurology* **68**, 1800–8 (2007).
102. S. C. Vlad, D. R. Miller, N. W. Kowall, D. T. Felson, Protective effects of NSAIDs on the development of Alzheimer disease., *Neurology* **70**, 1672–7 (2008).
103. D. Jaturapatporn, M. G. E. K. N. Isaac, J. McCleery, N. Tabet, Aspirin, steroidal and non-steroidal anti-inflammatory drugs for the treatment of Alzheimer's disease., *Cochrane Database of Systematic Reviews* , CD006378 (2012).
104. L. Hong, G. Koelsch, X. Lin, S. Wu, S. Terzyan, A. K. Ghosh, X. C. Zhang, J. Tang, Structure of the protease domain of memapsin 2 (beta-secretase) complexed with inhibitor., *Science (New York, N.Y.)* **290**, 150–3 (2000).
105. P. C. May, R. a Dean, S. L. Lowe, F. Martenyi, S. M. Sheehan, L. N. Boggs, S. a Monk, B. M. Mathes, D. J. Mergott, B. M. Watson, S. L. Stout, D. E. Timm, E. Smith Labell, C. R. Gonzales, M. Nakano, S. S. Jhee, M. Yen, L. Ereshefsky, T. D. Lindstrom, D. O. Calligaro, P. J. Cocke, D. Greg Hall, S. Friedrich, M. Citron, J. E. Audia, Robust central reduction of amyloid- β in humans with an orally available, non-peptidic β -secretase inhibitor., *The Journal of Neuroscience* **31**, 16507–16 (2011).

106. A. K. Ghosh, M. Brindisi, J. Tang, Developing β -secretase inhibitors for treatment of Alzheimer's disease., *Journal of Neurochemistry*, 71–83 (2012).
107. F. Gervais, J. Paquette, C. Morissette, P. Krzywkowski, M. Yu, M. Azzi, D. Lacombe, X. Kong, A. Aman, J. Laurin, W. a Szarek, P. Tremblay, Targeting soluble Abeta peptide with Tramiprosate for the treatment of brain amyloidosis., *Neurobiology of Aging* **28**, 537–47 (2007).
108. P. Aisen, D. Saumier, R. Briand, J. Laurin, F. Gervais, P. Tremblay, D. Garceau, A Phase II study targeting amyloid-beta with 3APS in mild-to-moderate Alzheimer disease., *Neurology* **67**, 1757–63 (2006).
109. Bellus, BLU8499 for Alzheimer's Disease (2012) (available at <http://www.bellushealth.com/English/products/nrm8499/default.aspx>).
110. J. McLaurin, M. E. Kierstead, M. E. Brown, C. a Hawkes, M. H. L. Lambermon, A. L. Phinney, A. a Darabie, J. E. Cousins, J. E. French, M. F. Lan, F. Chen, S. S. N. Wong, H. T. J. Mount, P. E. Fraser, D. Westaway, P. St George-Hyslop, Cyclohexanehexol inhibitors of Abeta aggregation prevent and reverse Alzheimer phenotype in a mouse model., *Nature Medicine* **12**, 801–8 (2006).
111. Elan, Elan And Transition Therapeutics Announce Topline Summary Results Of Phase 2 Study and Plans for Phase 3 for ELND005 (Scyllo-inositol) (2010) (available at <http://www.transitiontherapeutics.com/media/news.php>).
112. D. Morgan, Immunotherapy for Alzheimer's disease, *Journal of Alzheimer's Disease* **9**, 425–432 (2006).
113. D. Schenk, R. Barbour, W. Dunn, G. Gordon, H. Grajeda, T. Guido, K. Hu, J. Huang, K. Johnson-Wood, K. Khan, D. Kholodenko, M. Lee, Z. Liao, I. Lieberburg, R. Motter, L. Mutter, F. Soriano, G. Shopp, N. Vasquez, C. Vandever, S. Walker, M. Wogulis, T. Yednock, D. Games, P. Seubert, Immunization with amyloid-beta attenuates Alzheimer-disease-like pathology in the PDAPP mouse., *Nature* **400**, 173–7 (1999).
114. C. Holmes, D. Boche, D. Wilkinson, G. Yadegarfar, V. Hopkins, A. Bayer, R. W. Jones, R. Bullock, S. Love, J. W. Neal, E. Zotova, J. A. R. Nicoll, Long-term effects of Abeta42 immunisation in Alzheimer's disease: follow-up of a randomised, placebo-controlled phase I trial., *Lancet* **372**, 216–23 (2008).

115. J. Delrieu, P. J. Ousset, C. Caillaud, B. Vellas, “Clinical trials in Alzheimer’s disease’: immunotherapy approaches., *Journal of Neurochemistry* **120 Suppl**, 186–93 (2012).
116. F. Bard, C. Cannon, R. Barbour, R. L. Burke, D. Games, H. Grajeda, T. Guido, K. Hu, J. Huang, K. Johnson-Wood, K. Khan, D. Kholodenko, M. Lee, I. Lieberburg, R. Motter, M. Nguyen, F. Soriano, N. Vasquez, K. Weiss, B. Welch, P. Seubert, D. Schenk, T. Yednock, Peripherally administered antibodies against amyloid beta-peptide enter the central nervous system and reduce pathology in a mouse model of Alzheimer disease., *Nature Medicine* **6**, 916–9 (2000).
117. S. Salloway, R. Sperling, S. Gilman, N. C. Fox, K. Blennow, M. Raskind, M. Sabbagh, L. S. Honig, R. Doody, C. H. van Dyck, R. Mulnard, J. Barakos, K. M. Gregg, E. Liu, I. Lieberburg, D. Schenk, R. Black, M. Grundman, A phase 2 multiple ascending dose trial of bapineuzumab in mild to moderate Alzheimer disease., *Neurology* **73**, 2061–70 (2009).
118. E. R. Siemers, S. Friedrich, R. A. Dean, C. R. Gonzales, M. R. Farlow, S. M. Paul, R. B. Demattos, Safety and changes in plasma and cerebrospinal fluid amyloid beta after a single administration of an amyloid beta monoclonal antibody in subjects with Alzheimer disease., *Clinical Neuropharmacology* **33**, 67–73 (2010).
119. D. J. Selkoe, Preventing Alzheimer’s disease., *Science (New York, N.Y.)* **337**, 1488–92 (2012).
120. K. Honarnejad, A. Daschner, A. P. Gehring, A. Szybinska, A. Giese, J. Kuznicki, F. Bracher, J. Herms, Identification of tetrahydrocarbazoles as novel multifactorial drug candidates for treatment of Alzheimer’s disease from a high-throughput screen, *Manuskript eingereicht bei JBC* (2013).
121. T. Nagai, S. Yamada, T. Tominaga, M. Ichikawa, A. Miyawaki, Expanded dynamic range of fluorescent indicators for Ca(2+) by circularly permuted yellow fluorescent proteins., *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **101**, 10554–9 (2004).
122. K. Honarnejad, A. Daschner, A. Giese, A. Zall, B. Schmidt, A. Szybinska, J. Kuznicki, J. Herms, Development and Implementation of a High-throughput Compound Screening Assay for Targeting Disrupted ER Calcium Homeostasis in Alzheimer’s Disease, *Manuskript eingereicht bei PLoSone* , 1–28 (2013).

123. B. E. Thomas, D. Joseph-McCarthy, J. C. Alvarez, in *Pharmacophore Perception, Development and Use in Drug Design*, (2000), pp. 351–368.
124. C. Lipinski, F. Lombardo, B. W. Dominy, P. J. Feeney, Experimental and computational approaches to estimate solubility and permeability in drug discovery and development settings., *Advanced Drug Delivery Reviews* **46**, 3–26 (2001).
125. C. D. Mayer, F. Bracher, Cytotoxic ring A-modified steroid analogues derived from Grundmann's ketone., *European Journal of Medicinal Chemistry* **46**, 3227–36 (2011).
126. G. Thews, E. Mutschler, P. Vaupel, *Anatomie Physiologie Pathophysiologie des Menschen* (Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft, Stuttgart, 1999).
127. B. Ehrenberg, V. Montana, M. D. Wei, J. P. Wuskell, L. M. Loew, Membrane potential can be determined in individual cells from the nernstian distribution of cationic dyes., *Biophysical Journal* **53**, 785–94 (1988).
128. D. L. Farkas, M. D. Wei, P. Febroriello, J. H. Carson, L. M. Loew, Simultaneous imaging of cell and mitochondrial membrane potentials., *Biophysical Journal* **56**, 1053–69 (1989).
129. R. C. Scaduto, L. W. Grotyohann, Measurement of mitochondrial membrane potential using fluorescent rhodamine derivatives., *Biophysical Journal* **76**, 469–77 (1999).
130. R. M. Page, K. Baumann, M. Tomioka, B. I. Pérez-Revuelta, A. Fukumori, H. Jacobsen, A. Flohr, T. Luebbers, L. Ozmen, H. Steiner, C. Haass, Generation of Abeta38 and Abeta42 is independently and differentially affected by familial Alzheimer disease-associated presenilin mutations and gamma-secretase modulation., *The Journal of Biological Chemistry* **283**, 677–83 (2008).
131. G. Banker, K. Goslin, in *Culturing Nerve Cells*, (MIT press, 1991), pp. 251–282.
132. S. Kaech, G. Banker, Culturing hippocampal neurons., *Nature Protocols* **1**, 2406–15 (2006).
133. OECD, *Test No. 423: Acute Oral toxicity - Acute Toxic Class Method* (OECD Publishing, 2002), pp. 1–14.
134. J.-P. Kronenberger, J. Médioni, Food neophobia in wild and laboratory mice (*Mus musculus domesticus*), *Behavioural Processes* **11**, 53–59 (1985).

135. L. Zhang, Voluntary oral administration of drugs in mice, *Nature Protocol Exchange* (2011), doi:10.1038/protex.2011.236.
136. ALZET, Miniature Infusion Pumps for Mice (2008).
137. ALZET, Instruction and specification sheet Alzet Mini-Osmotic Pump Model 2006, (2008).
138. ALZET, Instruction and specification sheet Alzet Mini-Osmotic Pump Model 2002 (2008).
139. F. Plössl, M. Giera, F. Bracher, Multiresidue analytical method using dispersive solid-phase extraction and gas chromatography/ion trap mass spectrometry to determine pharmaceuticals in whole blood., *Journal of Chromatography* **1135**, 19–26 (2006).
140. A. Savonenko, G. M. Xu, T. Melnikova, J. L. Morton, V. Gonzales, M. P. F. Wong, D. L. Price, F. Tang, A. L. Markowska, D. R. Borchelt, Episodic-like memory deficits in the APPswe/PS1dE9 mouse model of Alzheimer's disease: relationships to beta-amyloid deposition and neurotransmitter abnormalities., *Neurobiology of Disease* **18**, 602–17 (2005).
141. C. Duyckaerts, M.-C. Potier, B. Delatour, Alzheimer disease models and human neuropathology: similarities and differences., *Acta Neuropathologica* **115**, 5–38 (2008).
142. G. Donmez, D. Wang, D. E. Cohen, L. Guarente, SIRT1 suppresses beta-amyloid production by activating the alpha-secretase gene ADAM10., *Cell* **142**, 320–32 (2010).
143. R. Radde, T. Bolmont, S. a Kaeser, J. Coomaraswamy, D. Lindau, L. Stoltze, M. E. Calhoun, F. Jäggi, H. Wolburg, S. Gengler, C. Haass, B. Ghetti, C. Czech, C. Hölscher, P. M. Mathews, M. Jucker, Abeta42-driven cerebral amyloidosis in transgenic mice reveals early and robust pathology., *EMBO Reports* **7**, 940–6 (2006).
144. W. E. Klunk, B. J. Bacsikai, C. Mathis, S. T. Kajdasz, M. E. McLellan, M. P. Frosch, M. L. Debnath, D. P. Holt, Y. Wang, B. T. Hyman, Imaging Abeta plaques in living transgenic mice with multiphoton microscopy and methoxy-X04, a systemically administered Congo red derivative., *Journal of Neuropathology and Experimental Neurology* **61**, 797–805 (2002).
145. J. Wang, K. Ramnarayan, D. Rideout, S. Mong, H. Zhu, C. Niemeyer, T. P. Brady, Methods and compositions for treating inflammatory diseases utilizing inhibitors of tumor necrosis factor activity. WO0032598 (1999).

146. Y. Amrani, R. A. Panettieri, N. Frossard, C. Bronner, Activation of the TNF α -p55 receptor induces myocyte proliferation and modulates agonist-evoked calcium transients in cultured human tracheal smooth muscle cells., *American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology* **15**, 55–63 (1996).
147. K. Aktories, U. Förstermann, H. Bernhard, K. Starke, *Allgemeine und spezielle Pharmakologie und Toxikologie* (Elsevier GmbH, München, 2005).
148. R. Bayer, R. Mannhold, Fendiline: a review of its basic pharmacological and clinical properties., *Pharmatherapeutica* **5**, 103–36 (1987).
149. G. Galley, K. Groebke Zbinden, M. Hoener, R. Norcross, H. Stalder, Use of 4-Imidazole derivatives for CNS disorders. WO2007/08556A2 (2007).
150. S. C. Mitchell, Phenothiazine: the parent molecule., *Current Drug Targets* **7**, 1181–9 (2006).
151. J. H. Burn, The pharmacology of chlorpromazine and promethazine., *Proceedings of the Royal Society of Medicine* **47**, 617–21 (1954).
152. M. J. Ohlow, B. Moosmann, Phenothiazine: the seven lives of pharmacology's first lead structure., *Drug Discovery Today* **16**, 119–31 (2011).
153. K. Honarnejad, A. Daschner, J. Herms, J. Kuznicki, F. Bracher, A. P. Gehring, Novel means and methods for treating diseases of the central nervous system, metabolic and cardiac diseases and aging. EP 12160864 (2012).
154. W. E. Müller, A. Eckert, C. Kurz, G. P. Eckert, K. Leuner, Mitochondrial dysfunction: common final pathway in brain aging and Alzheimer's disease-therapeutic aspects., *Molecular Neurobiology* **41**, 159–71 (2010).
155. G. Miller, Pharmacology. The puzzling rise and fall of a dark-horse Alzheimer's drug., *Science (New York, N.Y.)* **327**, 1309 (2010).
156. S. Zhang, L. Hedskog, C. a H. Petersen, B. Winblad, M. Ankarcrona, Dimebon (latrepirdine) enhances mitochondrial function and protects neuronal cells from death., *Journal of Alzheimer's Disease* **21**, 389–402 (2010).
157. M. Hayley, S. Perspicace, T. Schulthess, J. Seelig, Calcium enhances the proteolytic activity of BACE1: An in vitro biophysical and biochemical characterization of the BACE1-calcium interaction., *Biochimica et Biophysica Acta* **1788**, 1933–8 (2009).

158. G. A. Starmer, S. McLean, J. Thomas, Analgesic potency and acute toxicity of substituted anilides and benzamides., *Toxicology and Applied Pharmacology* **19**, 20–8 (1971).
159. G. Klebe, *Wirkstoffdesign-Entwurf und Entwicklung von Arzneistoffen* (Heidelberg, 2. Auflage., 2009).
160. A. Fleming, Penicillin: The Robert Campbell Oration., *The Ulster Medical Journal* **13**, 95–122.2 (1944).
161. Y. L. Zhang, Y. F. Keng, Y. Zhao, L. Wu, Z. Y. Zhang, Suramin is an active site-directed, reversible, and tight-binding inhibitor of protein-tyrosine phosphatases., *The Journal of Biological Chemistry* **273**, 12281–7 (1998).
162. D. J. Selkoe, The molecular pathology of Alzheimer's disease., *Neuron* **6**, 487–98 (1991).
163. C. Haass, D. J. Selkoe, Soluble protein oligomers in neurodegeneration: lessons from the Alzheimer's amyloid beta-peptide., *Nature Reviews. Molecular Cell Biology* **8**, 101–12 (2007).
164. D. J. Selkoe, Alzheimer's disease: genes, proteins, and therapy., *Physiological Reviews* **81**, 741–66 (2001).
165. D. J. Selkoe, E. Mandelkow, D. M. Holtzman, Deciphering Alzheimer disease., *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine* **2** (2012), doi:10.1101/cshperspect.a011460.
166. R. Medeiros, D. Baglietto-Vargas, F. M. LaFerla, The role of tau in Alzheimer's disease and related disorders., *CNS Neuroscience & Therapeutics* **17**, 514–24 (2011).
167. E. Köpke, Y. C. Tung, S. Shaikh, A. C. Alonso, K. Iqbal, I. Grundke-Iqbal, Microtubule-associated protein tau. Abnormal phosphorylation of a non-paired helical filament pool in Alzheimer disease., *The Journal of Biological Chemistry* **268**, 24374–84 (1993).
168. D. P. Hanger, K. Hughes, J. R. Woodgett, J. P. Brion, B. H. Anderton, Glycogen synthase kinase-3 induces Alzheimer's disease-like phosphorylation of tau: generation of paired helical filament epitopes and neuronal localisation of the kinase., *Neuroscience Letters* **147**, 58–62 (1992).

169. W. Noble, V. Olm, K. Takata, E. Casey, O. Mary, J. Meyerson, K. Gaynor, J. LaFrancois, L. Wang, T. Kondo, P. Davies, M. Burns, Veeranna, R. Nixon, D. Dickson, Y. Matsuoka, M. Ahlijanian, L. Lau, K. Duff, Cdk5 is a key factor in tau aggregation and tangle formation in vivo., *Neuron* **38**, 555–65 (2003).
170. J. M. Litersky, G. V Johnson, Phosphorylation by cAMP-dependent protein kinase inhibits the degradation of tau by calpain., *The Journal of Biological Chemistry* **267**, 1563–8 (1992).
171. G. Drewes, B. Lichtenberg-Kraag, F. Döring, E. M. Mandelkow, J. Biernat, J. Goris, M. Dorée, E. Mandelkow, Mitogen activated protein (MAP) kinase transforms tau protein into an Alzheimer-like state., *The EMBO Journal* **11**, 2131–8 (1992).
172. J. Baudier, R. D. Cole, Interactions between the microtubule-associated tau proteins and S100b regulate tau phosphorylation by the Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase II., *The Journal of Biological Chemistry* **263**, 5876–83 (1988).
173. G. Drewes, A. Ebnet, U. Preuss, E. M. Mandelkow, E. Mandelkow, MARK, a novel family of protein kinases that phosphorylate microtubule-associated proteins and trigger microtubule disruption., *Cell* **89**, 297–308 (1997).
174. G. V. Rayasam, V. K. Tulasi, R. Sodhi, J. A. Davis, A. Ray, Glycogen synthase kinase 3: more than a namesake., *British Journal of Pharmacology* **156**, 885–98 (2009).
175. R. Dhavan, L. H. Tsai, A decade of CDK5., *Nature Reviews. Molecular Cell Biology* **2**, 749–59 (2001).
176. D. B. Henley, P. C. May, R. A. Dean, E. R. Siemers, Development of semagacestat (LY450139), a functional gamma-secretase inhibitor, for the treatment of Alzheimer's disease., *Expert Opinion on Pharmacotherapy* **10**, 1657–64 (2009).
177. T. Morihara, T. Chu, O. Ubeda, W. Beech, G. M. Cole, Selective inhibition of Abeta42 production by NSAID R-enantiomers., *Journal of Neurochemistry* **83**, 1009–12 (2002).
178. T. Kukar, S. Prescott, J. L. Eriksen, V. Holloway, M. P. Murphy, E. H. Koo, T. E. Golde, M. M. Nicolle, Chronic administration of R-flurbiprofen attenuates learning impairments in transgenic amyloid precursor protein mice., *BMC Neuroscience* **8**, 54 (2007).

179. C. Szekely, R. C. Green, J. C. S. Breitner, T. Østbye, S. Beiser, M. M. Corrada, H. H. Dodge, M. Ganguli, C. H. Kawas, L. H. Kuller, B. M. Psaty, S. M. Resnick, P. Wolf, B. Zonderman, K. Welsh-Bohmer, P. P. Zandi, No advantage of Abeta 42-lowering NSAIDs for prevention of Alzheimer dementia in six pooled cohort studies., *Neurology* **70**, 2291–8 (2008).
180. K. Blennow, H. Zetterberg, A. M. Fagan, Fluid biomarkers in Alzheimer disease., *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine* (2012), doi:10.1101/cshperspect.a006221.
181. C. Baigent, L. Blackwell, J. Emberson, L. E. Holland, C. Reith, N. Bhala, R. Peto, E. H. Barnes, A. Keech, J. Simes, R. Collins, Efficacy and safety of more intensive lowering of LDL cholesterol: a meta-analysis of data from 170,000 participants in 26 randomised trials., *Lancet* **376**, 1670–81 (2010).
182. T. Arendt, Synaptic degeneration in Alzheimer's disease., *Acta Neuropathologica* **118**, 167–79 (2009).
183. P. D. Coleman, P. J. Yao, Synaptic slaughter in Alzheimer's disease., *Neurobiology of Aging* **24**, 1023–7 (2003).
184. S. Chakroborty, G. E. Stutzmann, Early calcium dysregulation in Alzheimer's disease: setting the stage for synaptic dysfunction., *Science China. Life sciences* **54**, 752–62 (2011).
185. A. Ho, J. Shen, Presenilins in synaptic function and disease., *Trends in Molecular Medicine* **17**, 617–24 (2011).
186. D. C. Swinney, J. Anthony, How were new medicines discovered?, *Nature Reviews Drug Discovery* **10**, 507–19 (2011).
187. F. Zanella, J. B. Lorens, W. Link, High content screening: seeing is believing., *Trends in Biotechnology* **28**, 237–45 (2010).
188. N. Solovyova, A. Verkhratsky, Monitoring of free calcium in the neuronal endoplasmic reticulum: an overview of modern approaches., *Journal of Neuroscience Methods* **122**, 1–12 (2002).
189. G. R. Monteith, G. S. J. Bird, Techniques: high-throughput measurement of intracellular Ca(2+)-back to basics., *Trends in pharmacological sciences* **26**, 218–23 (2005).

190. B. Apsel, J. Blair, B. Gonzalez, T. M. Nazif, M. E. Feldman, B. Aizenstein, R. Hoffman, R. L. Williams, K. M. Shokat, Z. Knight, Targeted polypharmacology: discovery of dual inhibitors of tyrosine and phosphoinositide kinases., *Nature Chemical Biology* **4**, 691–9 (2008).
191. T. Ito, H. Ando, T. Suzuki, T. Ogura, K. Hotta, Y. Imamura, Y. Yamaguchi, H. Handa, Identification of a primary target of thalidomide teratogenicity., *Science (New York, N.Y.)* **327**, 1345–50 (2010).
192. L. Burdine, T. Kodadek, Target identification in chemical genetics: the (often) missing link., *Chemistry & Biology* **11**, 593–7 (2004).
193. X. S. Zheng, T. Chan, H. H. Zhou, Genetic and genomic approaches to identify and study the targets of bioactive small molecules., *Chemistry & biology* **11**, 609–18 (2004).
194. T. R. Hughes, M. J. Marton, A. R. Jones, C. J. Roberts, R. Stoughton, C. D. Armour, H. A. Bennett, E. Coffey, H. Dai, Y. D. He, M. J. Kidd, A. M. King, M. R. Meyer, D. Slade, P. Y. Lum, S. B. Stepaniants, D. D. Shoemaker, D. Gachotte, K. Chakraborty, J. Simon, M. Bard, S. H. Friend, Functional discovery via a compendium of expression profiles., *Cell* **102**, 109–26 (2000).
195. D. W. Young, A. Bender, J. Hoyt, E. McWhinnie, G.-W. Chirn, C. Y. Tao, J. a Tallarico, M. Labow, J. L. Jenkins, T. J. Mitchison, Y. Feng, Integrating high-content screening and ligand-target prediction to identify mechanism of action., *Nature Chemical Biology* **4**, 59–68 (2008).
196. D. Fomina-Yadlin, S. Kubicek, D. Walpita, V. Dancik, J. Hecksher-Sørensen, J. Bittker, T. Sharifnia, A. Shamji, P. Clemons, B. K. Wagner, S. L. Schreiber, Small-molecule inducers of insulin expression in pancreatic alpha-cells., *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **107**, 15099–104 (2010).
197. H.-J. Knölker, K. R. Reddy, Isolation and synthesis of biologically active carbazole alkaloids., *Chemical Reviews* **102**, 4303–427 (2002).
198. Z. Liu, R. C. Larock, Synthesis of Carbazoles and Dibenzofurans via Cross-Coupling of o-Iodoanilines and o-Iodophenols with Silylaryl Triflates and Subsequent Pd-Catalyzed Cyclization., *Tetrahedron* **63**, 347–355 (2007).

199. G. Leonetti, C. G. Egan, Use of carvedilol in hypertension: an update., *Vascular Health and Risk Management* **8**, 307–22 (2012).
200. A. Pieper, S. Xie, E. Capota, S. J. Estill, J. Zhong, J. M. Long, G. L. Becker, P. Huntington, S. E. Goldman, C.-H. Shen, M. Capota, J. K. Britt, T. Kotti, K. Ure, D. J. Brat, N. S. Williams, K. S. MacMillan, J. Naidoo, L. Melito, J. Hsieh, J. De Brabander, J. M. Ready, S. L. McKnight, Discovery of a proneurogenic, neuroprotective chemical., *Cell* **142**, 39–51 (2010).
201. D. P. Rotella, G. R. McFarlane, A. Greenfield, C. Grosanu, A. J. Robichaud, R. A. Denny, R. W. Feenstra, S. Núñez-García, J.-H. Reinders, M. Van Der Neut, A. McCreary, C. G. Kruse, K. Sullivan, F. Pruthi, M. Lai, J. Zhang, D. M. Kowal, T. Carrick, S. M. Grauer, R. L. Navarra, R. Graf, J. Brennan, K. L. Marquis, M. H. Pausch, Tetrahydrocarbazole-based serotonin reuptake inhibitor/dopamine D2 partial agonists for the potential treatment of schizophrenia., *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* **19**, 5552–5 (2009).
202. K. S. Gudmundsson, P. R. Sebahar, L. D. Richardson, J. G. Catalano, S. D. Boggs, A. Spaltenstein, P. B. Sethna, K. W. Brown, R. Harvey, K. R. Romines, Substituted tetrahydrocarbazoles with potent activity against human papillomaviruses., *Bioorganic & medicinal chemistry letters* **19**, 3489–92 (2009).
203. M. Kelliher, J. Fastbom, R. F. Cowburn, W. Bonkale, T. G. Ohm, R. Ravid, V. Sorrentino, C. O'Neill, Alterations in the ryanodine receptor calcium release channel correlate with Alzheimer's disease neurofibrillary and beta-amyloid pathologies., *Neuroscience* **92**, 499–513 (1999).
204. S. Camandola, M. P. Mattson, Aberrant subcellular neuronal calcium regulation in aging and Alzheimer's disease., *Biochimica et Biophysica Acta* **1813**, 965–73 (2011).
205. W. Chadwick, N. Mitchell, B. Martin, S. Maudsley, Therapeutic targeting of the endoplasmic reticulum in Alzheimer's disease., *Current Alzheimer Research* **9**, 110–9 (2012).
206. B. Oules, D. Del Prete, B. Greco, X. Zhang, I. Lauritzen, J. Sevalle, S. Moreno, P. Paterlini-Brechot, M. Trebak, F. Checler, F. Benfenati, M. Chami, Ryanodine Receptor Blockade Reduces Amyloid- Load and Memory Impairments in Tg2576 Mouse Model of Alzheimer Disease, *Journal of Neuroscience* **32**, 11820–11834 (2012).

207. S. Chakroborty, C. Briggs, M. B. Miller, I. Goussakov, C. Schneider, J. Kim, J. Wicks, J. C. Richardson, V. Conklin, B. G. Cameransi, G. E. Stutzmann, Stabilizing ER Ca^{2+} channel function as an early preventative strategy for Alzheimer's disease., *PloS one* **7** (2012), doi:10.1371/journal.pone.0052056.
208. M. P. Mattson, M. Gleichmann, A. Cheng, Mitochondria in neuroplasticity and neurological disorders., *Neuron* **60**, 748–66 (2008).
209. R. X. Santos, S. C. Correia, X. Wang, G. Perry, M. A. Smith, P. I. Moreira, X. Zhu, Alzheimer's disease: diverse aspects of mitochondrial malfunctioning., *International Journal of Clinical and Experimental Pathology* **3**, 570–81 (2010).
210. G. P. Eckert, K. Renner, S. H. Eckert, J. Eckmann, S. Hagl, R. M. Abdel-Kader, C. Kurz, K. Leuner, W. E. Muller, Mitochondrial dysfunction-a pharmacological target in Alzheimer's disease., *Molecular Neurobiology* **46**, 136–50 (2012).
211. W. Sliwka, Mikroverkapselung, *Angewandte Chemie* **87**, 556–567 (1975).
212. H. Vogel, *Drug Discovery and Evaluation* (Springer Verlag, Berlin, 2006), p. 889.
213. G. A. Elder, M. A. Gama Sosa, R. De Gasperi, Transgenic mouse models of Alzheimer's disease., *The Mount Sinai Journal of Medicine, New York* **77**, 69–81 (2010).

7 Eigene Veröffentlichungen

Honarnejad K, **Daschner A**, Gehring A, Szybinska A, Giese A, Kuznicki J, Bracher F and Herms J. Discovery of a novel multifactorial drug candidate for treatment of Alzheimer's disease from a high-throughput compound screen.

Manuskript eingereicht (under revision)

Honarnejad K, **Daschner A**, Gehring A, Kuznicki J, Bracher F and Herms J. Development and Implementation of a High-throughput Compound Screening Assay for Targeting Disrupted ER Calcium Homeostasis in Alzheimer's Disease.

Manuskript eingereicht (under revision)

Daschner A, Honarnejad K, Gehring A, Kuznicki J, Bracher F and Herms J. A novel multifactorial drug candidate for Alzheimer's disease: high-throughput-screening, identification and efficacy characterization.

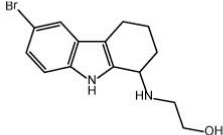
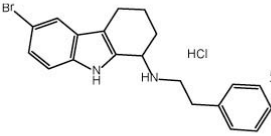

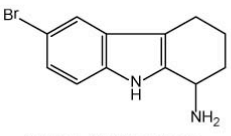
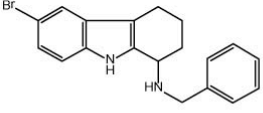
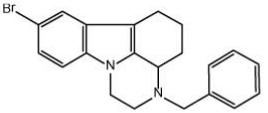
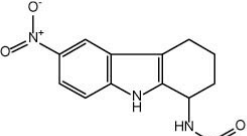
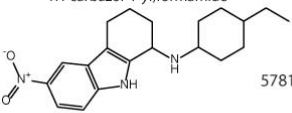
Posterpräsentation Miptec 24-28.09.12, Basel

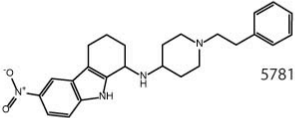
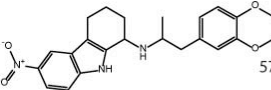
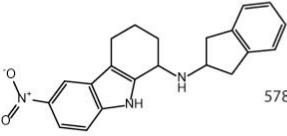
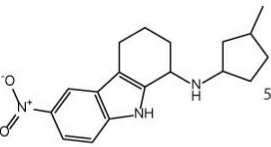
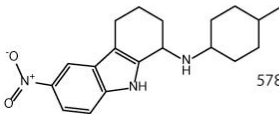
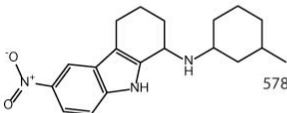
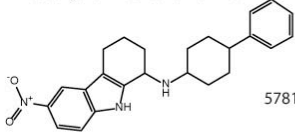
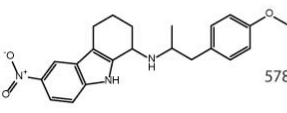
Ausgezeichnet mit dem **SLAS Young Scientists Award 2012**

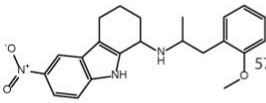
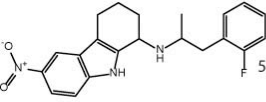
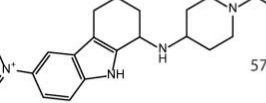
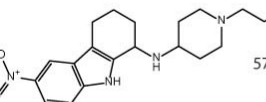
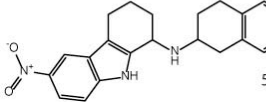
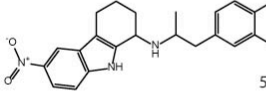
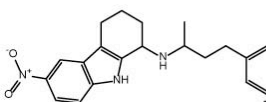
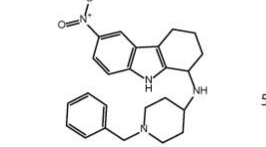
Honarnejad K, Herms J, **Daschner A**, Kuznicki J, Bracher F and Gehring A. *Novel means and methods for treating diseases of the central nervous system, metabolic and cardiac diseases and aging*. Europ. Patentanmeldung (EP 12 160 864.0), 22.03.12

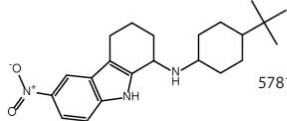
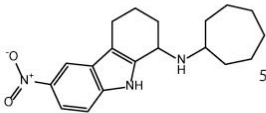
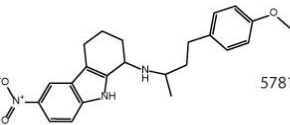
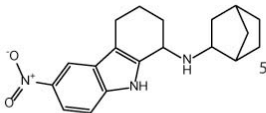
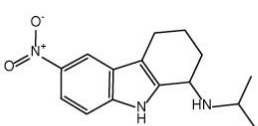
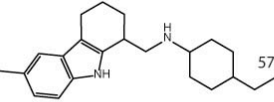
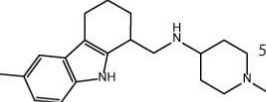
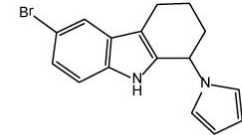
8 Anhang

8.1 Kommerziell verfügbare Carbazole

Compound Structure and name	ID	Molecular formula	MW	clogP	Calcium	TMRM	Aβ 42	Aβ 40	Aβ 38	MTT
 2-((6-bromo-2,3,4,9-tetrahydro-1H-carbazol-1-yl)amino)ethanol	5258947	C ₁₄ H ₁₇ BrN ₂ O	309.20	2.91	1.047	1.514	0.335	0.355	0.317	14.15
 6-bromo-N-phenethyl-2,3,4,9-tetrahydro-1H-carbazol-1-amine hydrochloride	5265927	C ₂₀ H ₂₂ BrClN ₂	405.76	5.60	0.791	1.922	0.292	0.278	0.176	> 50
 6-nitro-2,3,4,9-tetrahydro-1H-carbazol-1-amine	5302860	C ₁₂ H ₁₃ N ₃ O ₂	231.25	2.16	1.038	0.622	0.473	0.494	0.421	> 50
 6-bromo-2,3,4,9-tetrahydro-1H-carbazol-1-amine	5303801	C ₁₂ H ₁₃ BrN ₂	265.15	3.09	0.989	1.116	0.269	0.271	0.309	29.40
 N-benzyl-6-bromo-2,3,4,9-tetrahydro-1H-carbazol-1-amine	5307331	C ₁₉ H ₁₉ BrN ₂	355.27	4.66	0.703	1.508	0.683	0.503	0.357	> 50
 3-benzyl-8-bromo-2,3,3a,4,5,6-hexahydro-1H-pyrazino[3,2,1-jk]carbazole	5358447	C ₂₁ H ₂₁ BrN ₂	381.31	6.11	0.953	1.008	0.332	0.397	0.421	> 50
 N-(6-nitro-2,3,4,9-tetrahydro-1H-carbazol-1-yl)formamide	5373790	C ₁₃ H ₁₃ N ₃ O ₃	259.26	1.86	0.944	0.656	0.988	0.875	0.981	> 50
 N-(4-ethylcyclohexyl)-6-nitro-2,3,4,9-tetrahydro-1H-carbazol-1-amine	5781439	C ₂₀ H ₂₇ N ₃ O ₂	341.45	5.65	0.981	1.384	1.058	0.733	0.584	14.58

Compound Structure and name	ID	Molecular formula	MW	clogP	Calcium	TMRM	A β 42	A β 40	A β 38	MTT
 <p>6-nitro-N-(1-phenethylpiperidin-4-yl)-2,3,4,9-tetrahydro-1H-carbazol-1-amine</p>	5781441	C ₂₅ H ₃₀ N ₄ O ₂	418.53	4.56	0.914	2.357	0.566	0.531	0.523	> 50
 <p>N-(1-(3,4-dimethoxyphenyl)propan-2-yl)-6-nitro-2,3,4,9-tetrahydro-1H-carbazol-1-amine</p>	5781442	C ₂₃ H ₂₇ N ₃ O ₄	409.48	4.64	0.961	1.329	1.053	0.692	0.772	> 50
 <p>N-(2,3-dihydro-1H-inden-2-yl)-6-nitro-2,3,4,9-tetrahydro-1H-carbazol-1-amine</p>	5781444	C ₂₁ H ₂₁ N ₃ O ₂	347.41	4.56	0.917	1.046	0.785	0.769	0.857	> 50
 <p>1-methyl-N-((6-methyl-2,3,4,9-tetrahydro-1H-carbazol-1-yl)methyl)piperidin-4-amine</p>	5781446	C ₁₈ H ₂₃ N ₃ O ₂	313.39	4.57	0.933	1.259	1.038	0.593	0.594	> 50
 <p>N-(4-methylcyclohexyl)-6-nitro-2,3,4,9-tetrahydro-1H-carbazol-1-amine</p>	5781447	C ₁₉ H ₂₅ N ₃ O ₂	327.42	5.13	0.942	0.491	0.983	0.827	0.735	> 50
 <p>N-(3-methylcyclohexyl)-6-nitro-2,3,4,9-tetrahydro-1H-carbazol-1-amine</p>	5781448	C ₁₉ H ₂₅ N ₃ O ₂	327.42	5.13	0.966	1.545	0.593	0.726	0.593	29.98
 <p>6-nitro-N-(4-phenylcyclohexyl)-2,3,4,9-tetrahydro-1H-carbazol-1-amine</p>	5781451	C ₂₄ H ₂₇ N ₃ O ₂	389.49	6.01	0.967	1.180	1.093	0.777	0.648	16.58
 <p>N-(1-(4-methoxyphenyl)propan-2-yl)-6-nitro-2,3,4,9-tetrahydro-1H-carbazol-1-amine</p>	5781452	C ₂₂ H ₂₅ N ₃ O ₃	379.45	4.90	0.952	2.118	0.961	0.564	0.609	19.74

Compound Structure and name	ID	Molecular formula	MW	clogP	Calcium	TMRM	Aβ 42	Aβ 40	Aβ 38	MTT
 <p>N-(1-(2-methoxyphenyl)propan-2-yl)-6-nitro-2,3,4,9-tetrahydro-1H-carbazol-1-amine</p>	5781453	C ₂₂ H ₂₅ N ₃ O ₃	379.45	4.90	0.917	0.554	0.896	0.779	0.850	> 50
 <p>N-(1-(2-fluorophenyl)propan-2-yl)-6-nitro-2,3,4,9-tetrahydro-1H-carbazol-1-amine</p>	5781454	C ₂₁ H ₂₂ FN ₃ O ₂	367.42	5.12	0.925	0.433	0.846	0.706	0.692	> 50
 <p>N-(1-ethylpiperidin-4-yl)-6-nitro-2,3,4,9-tetrahydro-1H-carbazol-1-amine</p>	5781457	C ₁₉ H ₂₆ N ₄ O ₂	342.44	3.16	0.789	1.926	0.702	0.503	0.623	> 50
 <p>6-nitro-N-(1-propylpiperidin-4-yl)-2,3,4,9-tetrahydro-1H-carbazol-1-amine</p>	5781458	C ₂₀ H ₂₈ N ₄ O ₂	356.46	3.69	0.962	1.756	0.683	0.503	0.618	> 50
 <p>6-nitro-N-(1,2,3,4-tetrahydronaphthalen-2-yl)-2,3,4,9-tetrahydro-1H-carbazol-1-amine</p>	5781459	C ₂₂ H ₂₃ N ₃ O ₂	361.44	5.12	0.979	1.551	0.980	0.652	0.812	20.16
 <p>2-methoxy-4-(2-((6-nitro-2,3,4,9-tetrahydro-1H-carbazol-1-yl)amino)propyl)phenol</p>	5781461	C ₂₂ H ₂₅ N ₃ O ₄	395.45	4.16	1.030	1.499	0.875	0.718	0.794	> 50
 <p>6-nitro-N-(4-phenylbutan-2-yl)-2,3,4,9-tetrahydro-1H-carbazol-1-amine</p>	5781463	C ₂₂ H ₂₅ N ₃ O ₂	363.45	5.36	0.982	1.128	1.126	0.853	0.807	20.53
 <p>N-(1-benzylpiperidin-4-yl)-6-nitro-2,3,4,9-tetrahydro-1H-carbazol-1-amine</p>	5781464	C ₂₄ H ₂₈ N ₄ O ₂	404.50	4.42	0.895	3.256	0.575	0.539	0.486	> 50

Compound Structure and name	ID	Molecular formula	MW	clogP	Calcium	TMRM	Aβ 42	Aβ 40	Aβ 38	MTT
 <p>N-(4-(tert-butyl)cyclohexyl)-6-nitro-2,3,4,9-tetrahydro-1H-carbazol-1-amine</p>	5781465	C ₂₂ H ₃₁ N ₃ O ₂	369.50	6.45	0.959	1.157	0.891	0.747	0.585	15.18
 <p>N-cycloheptyl-6-nitro-2,3,4,9-tetrahydro-1H-carbazol-1-amine</p>	5781467	C ₂₂ H ₃₁ N ₃ O ₂	327.42	5.17	0.923	0.959	1.007	0.785	0.609	37.46
 <p>N-(4-(4-methoxyphenyl)butan-2-yl)-6-nitro-2,3,4,9-tetrahydro-1H-carbazol-1-amine</p>	5781468	C ₂₃ H ₂₇ N ₃ O ₃	393.48	5.28	0.936	1.476	1.000	0.868	0.668	23.36
 <p>N-(bicyclo[2.2.1]heptan-2-yl)-6-nitro-2,3,4,9-tetrahydro-1H-carbazol-1-amine</p>	5781469	C ₁₉ H ₂₃ N ₃ O ₂	325.40	4.89	0.942	0.892	1.068	0.596	0.628	> 50
 <p>N-isopropyl-6-nitro-2,3,4,9-tetrahydro-1H-carbazol-1-amine</p>	5781470	C ₁₅ H ₁₉ N ₃ O ₂	273.33	3.41	0.942	0.850	0.760	0.545	0.582	> 50
 <p>4-ethyl-N-((6-methyl-2,3,4,9-tetrahydro-1H-carbazol-1-yl)methyl)cyclohexanamine</p>	5781474	C ₂₂ H ₃₂ N ₂	324.50	6.21	0.437	0.641	1.471	0.769	0.815	> 50
 <p>1-methyl-N-((6-methyl-2,3,4,9-tetrahydro-1H-carbazol-1-yl)methyl)piperidin-4-amine</p>	5781475	C ₂₀ H ₂₉ N ₃	311.46	3.19	0.499	1.259	1.068	0.753	0.916	> 50
 <p>6-bromo-1-(1H-pyrrol-1-yl)-2,3,4,9-tetrahydro-1H-carbazole</p>	5920301	C ₁₆ H ₁₅ BrN ₂	315.21	4.98	0.869	0.831	0.492	0.481	0.449	24.84

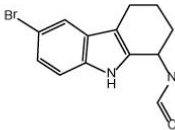
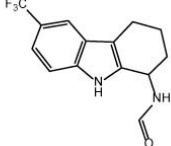
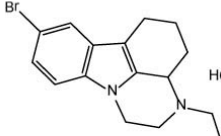
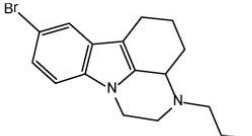
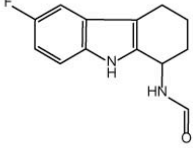
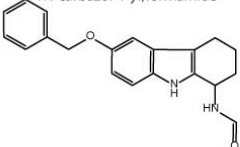
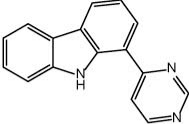
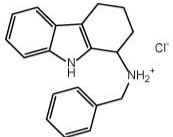
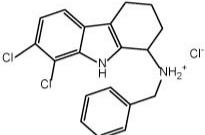
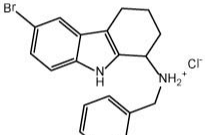
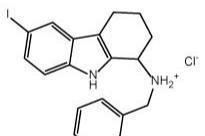
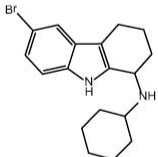
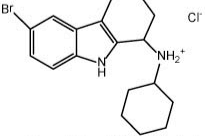
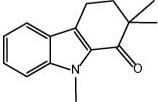
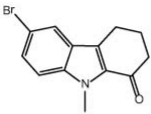
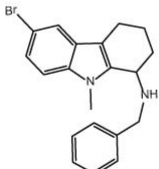
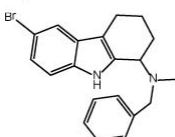
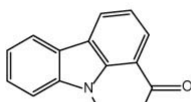
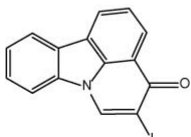
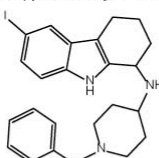
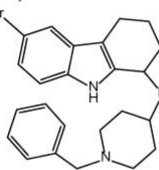
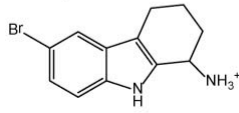
Compound Structure and name	ID	Molecular formula	MW	clogP	Calcium	TMRM	Aβ 42	Aβ 40	Aβ 38	MTT
 N-(6-bromo-2,3,4,9-tetrahydro-1H-carbazol-1-yl)formamide	5922537	C ₁₃ H ₁₃ BrN ₂ O	293.16	2.79	1.002	1.207	1.056	0.712	0.874	> 50
 N-(6-(trifluoromethyl)-2,3,4,9-tetrahydro-1H-carbazol-1-yl)formamide	5922756	C ₁₄ H ₁₃ F ₃ N ₂ O	282.26	2.93	1.001	1.236	0.999	1.033	1.057	> 50
 8-bromo-3-ethyl-2,3,3a,4,5,6-hexahydro-1H-pyrazino[3,2,1-jk]carbazole hydrochloride	6044730	C ₁₆ H ₂₀ BrClN ₂	355.70	4.72	0.968	0.745	1.180	0.745	1.003	> 50
 8-bromo-3-propyl-2,3,3a,4,5,6-hexahydro-1H-pyrazino[3,2,1-jk]carbazole	6049723	C ₁₇ H ₂₁ BrN ₂	333.27	5.25	0.961	0.663	0.840	0.642	0.817	> 50
 N-(6-fluoro-2,3,4,9-tetrahydro-1H-carbazol-1-yl)formamide	7129409	C ₁₃ H ₁₃ FN ₂ O	232.25	2.07	0.958	0.860	0.592	0.470	0.589	> 50
 N-(6-(benzyloxy)-2,3,4,9-tetrahydro-1H-carbazol-1-yl)formamide	7173317	C ₂₀ H ₂₀ N ₂ O ₂	320.38	3.55	0.998	0.606	1.012	0.997	1.104	> 50

Abb. 45: Vertreter der kommerziell erworbenen Carbazole

Zu sehen sind die Strukturformel, der IUPAC Name, ID, die Summenformel, das Molekulargewicht [g/mol], der kalkulierte logP (clogP), die gemessenen normalisierten Ergebnisse der zellulären Assays bei 10 µM (Kalzium, Mitochondrien (TMRM), Abeta) und der IC₅₀-Wert [µM] des MTT Tests.

8.2 Synthetisierte Carbazole

Compound Structure and name	ID	Molecular formula	MW	clogP	Calcium	TMRM	Aβ 42	Aβ 40	Aβ 38	MTT
 1-(pyrimidin-4-yl)-9H-carbazole	gea_82	C ₁₆ H ₁₁ N ₃	245.28	3.16	0.974	0.926	1.080	1.086	1.164	> 50
 N-benzyl-2,3,4,9-tetrahydro-1H-carbazol-1-aminium chloride	gea_83	C ₁₉ H ₂₀ ClN ₂	312.84	4.63	0.991	1.219	1.050	0.835	0.635	38.21
 N-benzyl-7,8-dichloro-2,3,4,9-tetrahydro-1H-carbazol-1-aminium chloride	gea_84	C ₁₉ H ₁₈ Cl ₂ N ₂	381.73	6.16	1.011	1.049	1.100	1.050	0.913	47.82
 N-benzyl-6-bromo-2,3,4,9-tetrahydro-1H-carbazol-1-aminium chloride	gea_85	C ₁₉ H ₂₀ BrClN ₂	391.73	5.66	0.879	1.444	0.910	0.765	0.651	13.5
 N-benzyl-6-iodo-2,3,4,9-tetrahydro-1H-carbazol-1-aminium chloride	gea_86	C ₁₉ H ₂₀ ClIN ₂	438.73	5.92	0.913	1.444	0.901	0.767	0.629	13.42
 6-bromo-N-cyclohexyl-2,3,4,9-tetrahydro-1H-carbazol-1-amine	gea_87	C ₁₈ H ₂₃ BrN ₂	347.29	5.53	0.946	0.998	0.779	0.564	0.479	9.43
 6-bromo-N-cyclohexyl-2,3,4,9-tetrahydro-1H-carbazol-1-aminium chloride	gea_87_HCl	C ₁₈ H ₂₄ BrClN ₂	383.75	6.01	0.914	0.926	0.848	0.608	0.610	N/A
 2,2,9-trimethyl-2,3,4,9-tetrahydro-1H-carbazol-1-one	gea_88	C ₁₅ H ₁₇ NO	227.30	3.80	0.977	0.814	1.218	0.850	1.013	62.46

Compound Structure and name	ID	Molecular formula	MW	clogP	Calcium	TMRM	A β 42	A β 40	A β 38	MTT
 6-bromo-9-methyl-2,3,4,9-tetrahydro-1H-carbazol-1-one	gea_89	C ₁₃ H ₁₂ BrNO	278.14	3.65	0.947	0.858	0.956	0.772	0.948	> 50
 N-benzyl-6-bromo-9-methyl-2,3,4,9-tetrahydro-1H-carbazol-1-amine	gea_90	C ₂₀ H ₂₁ BrN ₂	369.30	5.00	0.972	1.024	0.891	0.806	0.892	39.05
 N-benzyl-6-bromo-N-methyl-2,3,4,9-tetrahydro-1H-carbazol-1-amine	gea_92	C ₂₀ H ₂₁ BrN ₂	369.30	5.74	1.000	0.724	0.815	0.754	0.745	31.63
 4H-pyrido[3,2,1-jk]carbazol-4-one	gea_94	C ₁₅ H ₉ NO	219.24	1.96	0.960	0.716	1.075	1.110	1.019	50.77
 5-iodo-4H-pyrido[3,2,1-jk]carbazol-4-one	gea_95	C ₁₅ H ₈ INO	345.13	3.09	0.974	0.926	1.031	0.993	0.991	> 50
 N-(1-benzylpiperidin-4-yl)-6-iodo-2,3,4,9-tetrahydro-1H-carbazol-1-amine	gea_96	C ₂₄ H ₂₈ IN ₃	485.40	5.61	0.840	2.100	0.542	0.520	0.461	13.32
 N-(1-benzylpiperidin-4-yl)-6-bromo-2,3,4,9-tetrahydro-1H-carbazol-1-amine	gea_97	C ₂₄ H ₂₈ BrN ₃	438.40	5.35	0.894	2.335	0.530	0.552	0.487	12.69
 6-bromo-2,3,4,9-tetrahydro-1H-carbazol-1-aminium	gea_99	C ₁₂ H ₁₄ BrClN ₂	301.61	3.14	0.997	1.563	0.506	0.489	0.586	27.45

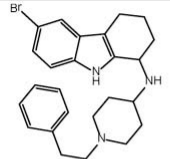
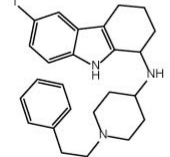
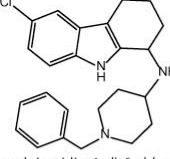
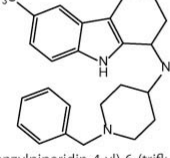
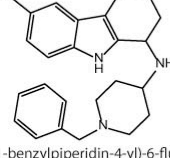
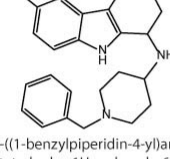

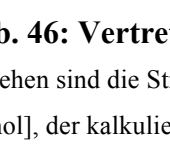
Compound Structure and name	ID	Molecular formula	MW	clogP	Calcium	TMRM	Aβ 42	Aβ 40	Aβ 38	MTT
 6-bromo-N-(1-phenethylpiperidin-4-yl)-2,3,4,9-tetrahydro-1H-carbazol-1-amine	gea_101	C ₂₅ H ₃₀ BrN ₃	452.43	5.49	0.856	1.929	0.449	0.513	0.441	18.07
 6-iodo-N-(1-phenethylpiperidin-4-yl)-2,3,4,9-tetrahydro-1H-carbazol-1-amine	gea_102	C ₂₅ H ₃₀ IN ₃	499.43	5.74	0.871	1.726	0.523	0.480	0.479	18.05
 N-(1-benzylpiperidin-4-yl)-6-chloro-2,3,4,9-tetrahydro-1H-carbazol-1-amine	gea_129	C ₂₄ H ₂₈ ClN ₃	393.95	5.2	0.832	1.862	0.327	0.383	0.311	15.41
 N-(1-benzylpiperidin-4-yl)-6-(trifluoromethyl)-2,3,4,9-tetrahydro-1H-carbazol-1-amine	gea_130	C ₂₅ H ₂₈ F ₃ N ₃	427.51	5.50	0.763	2.214	0.426	0.478	0.514	15.5
 N-(1-benzylpiperidin-4-yl)-6-fluoro-2,3,4,9-tetrahydro-1H-carbazol-1-amine	gea_132	C ₂₄ H ₂₈ FN ₃	377.50	4.63	0.834	2.004	0.295	0.361	0.342	30.96
 N-(1-benzylpiperidin-4-yl)-6-cyano-2,3,4,9-tetrahydro-1H-carbazol-1-amine	gea_133	C ₂₅ H ₂₈ N ₄	384.52	4.14	0.899	2.636	0.273	0.308	0.296	51.79
 1-((1-benzylpiperidin-4-yl)amino)-2,3,4,9-tetrahydro-1H-carbazole-6-carbonitrile	gea_139	C ₂₅ H ₃₀ BrN ₃	452.43	5.91	0.963	1.646	0.504	0.576	0.514	22.75
 N-(1-benzylpiperidin-4-yl)-2-bromo-5,6,7,8,9,10-hexahydrocyclohepta[b]indol-6-amine										

Abb. 46: Vertreter der von André Gehring synthetisierten Carbazole

Zu sehen sind die Strukturformel, der IUPAC Name, ID, die Summenformel, das Molekulargewicht [g/mol], der kalkulierte logP (clogP), die gemessenen normalisierten Ergebnisse der zellulären Assays bei 10 µM (Kalzium, Mitochondrien (TMRM), Abeta) und der IC₅₀-Wert [µM] des MTT Tests.

8.3 Danksagung

Zu Beginn möchte ich mich vor allem bei Prof. Dr. Jochen Herms für die Betreuung meiner Dissertation und die freundliche Zusammenarbeit bedanken. In vielen kritischen und konstruktiven Gesprächen wurde dieses Projekt möglich gemacht. Vielen Dank dafür.

Bei Prof. Dr. Franz Bracher bedanke ich mich für die Vertretung vor der Fakultät für Chemie und Pharmazie, die gemeinsame Arbeit an der Patentschrift und an den Diskussionen zum chemischen Strukturraum der Carbazole.

Mein besonderer Dank gilt Kamran Honarnejad, der für mein Projekt essentielle Vorarbeit geleistet hatte und mir immer mit Rat und Tat zur Seite stand.

Für die kritische Durchsicht dieser Arbeit möchte ich mich ganz herzlich bei Manu Dorostkar, Madlen Sophie und Wolfgang Daschner bedanken.

André Gehring danke ich für die schnelle und gewissenhafte Synthetisierung der einzelnen Strukturvariationen, bei Christoph Müller für die GC-MS-Messungen.

Vielen Dank auch an alle Mitglieder der AG Herms für die nette Arbeitsatmosphäre und dem stets offenen Ohr bei Fragen und Diskussionen.

Ganz besonders danke ich meinen Eltern, Angelika und Wolfgang Daschner für ihre immer vorhandene Unterstützung.

Zum Schluss gilt mein spezieller Dank meiner Frau Madlen Sophie für ihre Geduld, ihre Unterstützung und dafür, dass sie immer für mich da ist und die ganze Zeit an mich geglaubt hat.